VOLUMEN 8 DICIEMBRE, 1960 FASCICULO 2

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL



SAN JOSE COSTA RICA

Los artículos que se deseen someter para su publicación deberán ser enviados a: Dirección de "REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL", Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, Costa Rica, A. C. La correspondencia relativa a canje y suscriciones deberá dirigirse a: Biblioteca de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, Costa Rica, A. C.

REVISTA

DE

BIOLOGIA TROPICAL

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VOLUMEN 8 DICIEMBRE, 1960 FASCICULO 2

SUMARIO

EDITORIAL

La Dirección y el Comité de Redacción de la REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL se unen, muy complacidamente, al justo y noble homenaje que, con motivo del año de su jubilación, los discípulos y amigos del Profesor Doctor Eduardo Caballero y Caballero, han dedicado al querido Maestro.

El martes 30 de agosto del presente año, a las 19 horas y en el Auditorio de la Escuela Superior de Medicina Rural, en la capital mexicana, se dió cita un grupo numeroso de admiradores del Doctor Caballero, para hacerle entrega, en un acto solemne, de un hermoso libro jubilar que reune valiosas colaboraciones de investigadores mexicanos y extranjeros.

Caballero ha completado sus 30 años de religiosa dedicación ininterrumpida a la enseñanza y a la investigación científicas y sus amigos y admiradores han sabido reconocerle un merecido elevado puesto como indiscutible propulsor de la actual escuela helmintológica mexicana, que él muy dignamente heredara de su maestro y amigo el Doctor Isaac Ochoterena.

La experiencia científica incontestable de don Eduardo, se trasluce a través de las 180 publicaciones que ha producido hasta hoy, algunas de ellas libros y monografías muy valiosas, y sus enseñanzas seguirán produciéndose ya que el Maestro se retira oficialmente de sus labores académicas sin abandonar su puesto de avanzada en el laboratorio, al lado de sus discípulos y colaboradores inmediatos.

En lo personal, se diría que el Maestro hace honor a su apellido duplicado, que a pocas personas calificaría con tanta propiedad y exactitud.

La figura de Caballero y Caballero está especialmente ligada a la Ciencia costarricense, toda vez que el generoso y experimentado helmintólogo mexicano, durante el corto tiempo que pasó en nuestro país, sembró semilla de inquietud y devoción hacia la investigación científica.

LA DIRECCION



Dr. Eduardo Caballero y C.

Rev. Biol. Trop., 8(2):147-153, 1960

Una especie nueva de Guarea (Meliaceae) con hojas de crecimiento indefinido

por

Jorge León*

(Recibido para su publicación el 25 de mayo, 1960)

El género *Guarea* L. está representado en Costa Rica por 15 especies. La especie nueva que se describe a continuación, pertenece a un grupo morfológico suramericano, de hojas con raquis alado, el cual se registra por primera vez en Norteamérica.

Guarea turrialbana J. León sp. nov.

Arbor 8-22 m alt.; caulis 18-32 cm diam.; cortex rugosus, intus rubescens. Folia alterna incremento indefinito, 2-12 paribus folialis oppositis. Petiolus brevis, robustus, conicus. Rachis alata, 22-103 cm longa; alae foliaceae virides, 2-11 mm latae. Lamina lanceolata-oblonga vel ovalata, 5-43 cm longa x 3-26 cm lata, basi acuta vel obtusa, apice acutos vel acuminatos; supra atro-viridis, glabra, subtus flavoviridis, lepidota, nervo medio prominenti, lateralibus 5-18, prominentibus, obtuse ascendentibus, versus marginem arcuatis, evanescentibus; margine integra. Paniculae floriferae axillares, 15-42 cm longae. Ramulis alternis, ramificatis, inferioribus usquead 29 cm. longis. Pedicelli 1 mm longi, articulati, puberuli, cum 1-3 floribus. Bracteola minuta triangulata. Calix cupuliformis, viridis, 4 lobis obtusis pubescentibus. Petala 3-4, oblonga, 8-10 mm longa, 1-3 mm lata, exterius pubescentia. Antherae oblongae 5-8, omnino inclusae in tubo. Staminorum tubus cylindricus, 4 mm. longus, minutissime pubescens. Ovarium oblongum, minute pubescens, 2-loculare; loculus 2-ovulis superpositis. Stigma discoideum. Cápsula

---

* Jefe, Departamento de Fitotecnia, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica.

obcordata, 18-22 mm longa, 20-24 mm lata, in 2 valvas dehiscens, 2 loculis monospermis; basi triangulata robusta, nervi valde noti, evanescentes circa apicem. Semina oblonga, plano-convexa, rubra, 15-18 mm longa, 8-15 mm lata.

Arbol, 8-22 m de alto; diámetro a la altura del pecho 18-32 cm; cañón 3-14 m de largo; corteza de superficie rugosa, surcada a veces hondamente o mamelonada, rojiza. Ramificación escasa, ascendente, formando una copa angosta e irregular.

Hojas alternas, con 2-12 pares de foliolos opuestos. Raquis cilíndrico o ligeramente pentagonal, alado, verde, glabro, de 22-103 cm de largo; ala muy desarrollada, verde, de 2-11 mm de ancho, más anchas hacia el extremo distal; yema terminal pardo oscura, recurvada, pubescente. Pecíolo corto, grueso, cónico, liso o estriado. Foliolos coriáceos, generalmente de diferente tamaño en un par; peciólulos cortos, de 7-9 mm de largo por 4-6 mm de ancho, cónicos, estriados; lámina lanceolada-oblonga u ovada, de 5-43 cm de largo por 3-26 cm de ancho; base aguda u obtusa, a menudo el borde doblado en forma de aurícula. Apice agudo o acuminado, el acumen triangular, de 6-24 mm de largo; borde entero, generalmente plano o reflexo hacia la parte inferior; haz glabra, verde brillante, bronceada en estado juvenil, verde oscuro en la madurez; envés verde claro a amarillento, lepidoto; nervio mediano ligeramente prominente en la haz saliente en el reverso; nervios laterales de 5-18 pares, formando ángulos muy abiertos en la base, marcadamente arqueados en el borde, bien notables en la haz, prominentes en el reverso; nerviación transversal muy escasa, apenas perceptible en el lado inferior.

Inflorescencia panicular-racemiforme, axilar, de 15-42 cm de largo por 6-58 cm de ancho; eje fuerte, glabro, redondo, de 6-35 cm de largo; ramillas alternas, laxas, redondas, las inferiores hasta de 29 cm de largo, ramificadas. Pedicelo corto 1 mm o menos, articulado, pubescente; bractéolas muy pequeñas, triangulares. Cáliz cupular, hasta 1 mm de alto por 1,5 mm de ancho, con 4 lobos obtusos, exteriormente pubescehte, verdoso. Pétalos 3-4, oblongos, blancos, libres en su mitad superior, de 8-10 mm de largo por 1,5 mm de ancho, con una ligera contracción cerca del ápice, bordes y cara externa con pubescencia fina y rala. Tubo estaminal cilíndrico o ligeramente tetrágono, con bordes doblados hacia dentro, de 3,5-4 mm de alto por 5 mm de ancho, blanco ligeramente pubescente por fuera; el interior con pequeños surcos entre las anteras; borde recortado irregularmente, pubescente .Anteras oblongas 5-8, generalmente 7 u 8, de 1 mm de largo, colocadas dentro del interior del tubo, pocas veces sobresaliendo de éste. Ovario sobre columna discoidea corta, ovoideo, velloso con 2 lóculos, cada uno con 2 óvulos superpuestos. Estilo de 2-3 mm de largo, pubescente. Estigma discoideo.

Fruto, una cápsula obcordiforme, de 18-22 mm de largo por 20-24 mm de ancho; pedicelo triangular, 8-10 mm largo, leñoso, estriado; fruta rojiza en madurez, corrugada con una depresión central bien marcada; nervios prominen-

tes, que salen de la base del pedicelo y terminan en el borde de las valvas; pericarpio duro, 1 mm de grueso; dehiscencia septífraga, casi hasta la base del fruto, en dos valvas; celdas 2, o por aborto 1, con una sola semilla desarrollada. Semilla oblonga, plano-convexa, 15-18 mm de largo, 8-15 mm ancho, 6-8 mm de grosor; arilo delgado, rojo-anaranjado; cotiledones carnosos.

TIPO: Costa Rica, Prov. de Cartago, Turrialba, terrenos del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Jorge León 3522 (en flor), 31 de mayo 1951. Herbario del Instituto; dupl. herb. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Jorge León Nº 2220, igual localidad, 11 febrero 1950 (en fruto).

Esta especie pertenece a un grupo reducido caracterizado por tener el raquis de la hoja alado (3). Otras dos especies han sido descritas que tienen esa característica: *G. aligera* Harms (1) y *G. eriorhachis* Harms (2), ambas del Oriente peruano (Loreto). Colecciones de estas mismas especies se conocen también de áreas vecinas en Brasil. Las relaciones entre las tres especies no serán aclaradas hasta que se conozca un mayor número de colecciones.

NOTAS BIOLOGICAS

HABITAT.—Arbol de la selva húmeda subtropical (600 m altura), abundante, especialmente en el curso medio del Reventazón, cerca de Turrialba (terrenos del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas). Florece desde fines de mayo a junio y sus grandes panículos abren paulatinamente; las flores blancas y perfumadas una vez abiertas duran de 2 a 3 días y caen, muchas de ellas completas. Los frutos desarrollados son pocos en cada panículo y alcanzan la época de dehiscencia en febrero; la mayor parte caen íntegros al suelo, lo cual no facilita su germinación.

MIRMECOFILIA.—En las ramas nuevas es común encontrar los túneles de hormigas negras pequeñas, taladrados en el corazón del tronco que en esta parte es de estructura suave y corchosa.

PRODUCCION DE HOJUELAS NUEVAS.—El crecimiento indefinido del raquis y la producción de hojuelas nuevas en una hoja compuesta, es un fenómeno muy raro. Es de gran interés desde el punto de vista biológico, puesto que el raquis de una hoja actúa en estos casos, como una rama lateral. En *Guarea* este hecho fue señalado por SONNTAG (6); SKUTCH (5) lo describió detallalladamente en *G. rhopalocarpa* Radlk, de las tierras altas de Costa Rica, y MUZIK y CRUZADO (4) en *G. trichiloides* L. de Puerto Rico. En la presente especie el crecimiento de folíolos nuevos coincide con el alargamiento terminal y la formación de hojas nuevas, siendo muy marcado de febrero a junio, e ignorándose si ocurre todos los años. Es más conspicuo en los árboles jóvenes.

Las hojas viejas muestran varias etapas de crecimiento. Los primeros pares de folíolos, generalmente 2 ó 3, son más cortos que los posteriores y su lámina más redondeada, habiendo algunas francamente ovales; como se dijo

en la descripción, las hojuelas de un mismo par son por lo común desiguales. Un ejemplo típico es el siguiente, tomado de una hoja cuyo raquis mide 110 cm, y presenta tres etapas de crecimiento:

			Dimensiones en mm	
			Folíolo	Folíolo
Primera etapa	1	par	176 x 92	185 x 92
	2	"	244 x 108	245 x 116
	3	"	304 x 112	309 x 116
	4	"	362 x 104	342 x 117
	5	"	321 x 100	320 x 116
Segunda etapa	6	"	396 x 135	382 x 130
	7	"	382 x 146	386 x 138
	8	"	410 x 142	402 x 136
	9	"	324 x 112	380 x 138
	10	"	caído	caído
Tercer etapa	11	"	58 x 15	56 x 17
	12	"	22 x 6	23 x 6

El crecimiento nuevo se inicia por una elongación del raquis, el cual lleva en su extremo varias yemas foliares. Estas yemas, de color pardo claro, no están protegidas, pero presentan una pubescencia fuerte, ferrugínea, y en cada una de ellas pueden distinguirse varios pares de folíolos. El ápice afecta la misma estructura que el raquis, apareciendo las alas como bordes bien marcados. Las hojuelas nuevas son de un color bronceado oscuro, uniforme, tanto en el raquis como en la lámina, suaves, y con pubescencia escasa, más notable en el reverso del nervio central. Son colgantes, casi tocándose el reverso de las hojuelas del mismo par, mientras que las ya maduras se sitúan en el plano del raquis, y son de un verde brillante. Conforme avanzan en edad las hojuelas nuevas van cambiando color, primero a un amarillo pálido, luego al verde; conservan sin embargo, por bastante tiempo, manchas bronceadas especialmente a los lados de la costa. Poco después de la florescencia es común ver folíolos viejos, amarillos, que caen pronto, dejando el raquis descubierto; la caída de hojas enteras ocurre raras veces. Cortes del pecíolo arriba del pulvino en la hoja estudiada muestran que existen 2 anillos de crecimiento completos, y un tercero apenas en formación; los haces vasculares y la médula presentan la forma típica de los pecíolos.

SUMARIO

Se describe *Guarea turrialbana* J. León, sp. nov. Se trata de un árbol de hojas compuestas, raquis alado y crecimiento indeterminado; fue colectada esta especie, en los bosques húmedos subtropicales de Turrialba, en las tierras bajas de Costa Rica.

SUMMARY

Guarea turrialbana J. León, sp. nov. is described. It is a tree with compound leaves having a winged rhachis and indeterminate growth, collected in Turrialba, in the subtropical humid forest of the Atlantic lowlands of Costa Rica.

REFERENCIAS

1. HARMS, H.
1927. *Notizbl. Bot. Gart. Berlin*, 10:181.

2. HARMS, H.
1928. Uber einige amerikanische Meliacean, *Notizbl. Bot. Gart. Berlin*, 10:241-248.

3. HARMS, H.
1940. Meliaceae en *E. & Pr., Natürl. Pflanzenfam.* 2e *Aufl.* 19 bi.

4. MUZIK, T. J., & H. J. CRUZADO
1937. Studies on the growth of the leaf of *Guarea. Lloydia*, 20:121-215.

5. SKUTCH, A. F.
1946. A compound leaf with annual increments of growth. *Bull. Torrey Club*, 73: 542-546.

6. SONNTAG, P.
1887. Uber die Dauer des Scheitelwachstums und Entwicklungsgeschichte des Blattes. *Jahrb. wis. Bot.*, 18: 236-226.

Fig. 1: Flor, aspecto externo.

Fig. 2: Flor abierta mostrando la posición de las anteras.

Fig. 3: Pistillo.

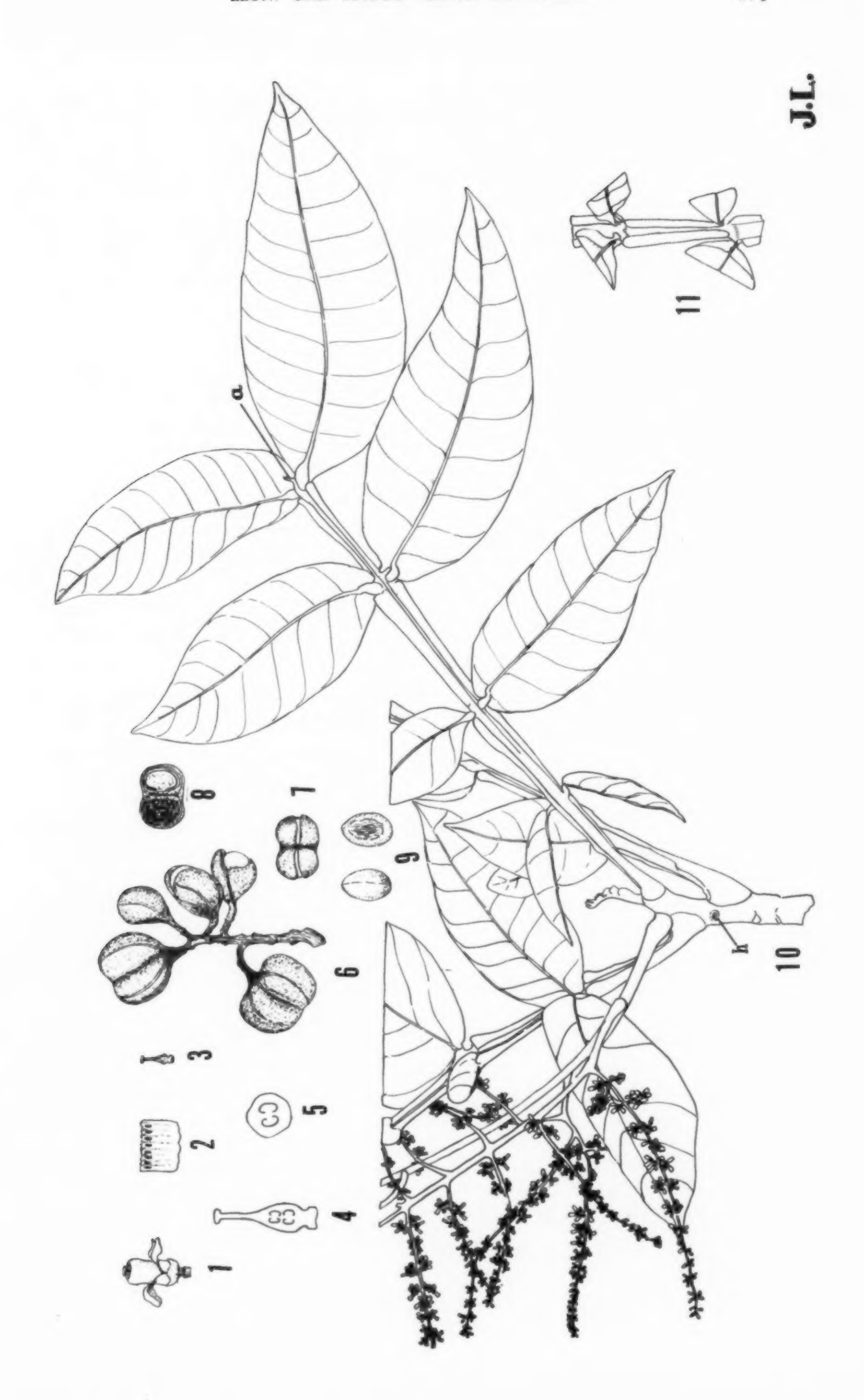
Figs. 4-5: Placentación.

Figs. 6-7-8: Frutos.

Fig. 9: Semilla.

Fig. 10: Rama joven mostrando el crecimiento apical (a) y los agujeros de hormigas (h).

Fig. 11: Detalle del raquis de la hoja.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
a.
h
J.L.

Rev. Biol. Trop., 8(2):155-163, 1960

Un caso de actinomicosis cervicofacial por Actinomyces bovis

por

Walter Hidalgo R.* Hilda Xirinachs de Hidalgo *

Enrique Cappella R.** y Elfrén Solano***

(Recibido para su publicación el 7 de junio de 1960)

La siguiente descripción corresponde a un caso de actinomicosis cervicofacial, cuyo diagnóstico fue realizado en el Laboratorio Bacteriológico del Hospital San Juan de Dios. Este caso fue atendido en el Servicio de Odontología y tratado posteriormente en los Servicios de Cirugía y Medicina de la misma Institución.

A pesar de tener la actinomicosis una distribución geográfica muy amplia, no tenemos noticia de casos humanos relatados en la literatura médica de nuestro país.

HISTORIA CLÍNICA.—G. P. H., registro Nº 027529, paciente de sexo femenino, de 32 años de edad, raza blanca, vecina de Gamalotillo de Puriscal, provincia de San José, con un embarazo de seis meses de evolución. Ingresó al Hospital en marzo de 1960 con un proceso inflamatorio agudo similar al de una celulitis o flemón de origen dentario, localizado en la región izquierda de la cara, además de edema y múltiples fístulas en estado activo, cerca del borde inferior de la mandíbula y región geniana del mismo lado, y cicatrices de fístulas curadas en el borde mandibular derecho. Discreto trismus de ambas articulaciones temporomandibulares y una boca cuyas condiciones alveolodentarias dejaban ver gran cantidad de restos radiculares. Las condiciones higiénicas de la lesión mostraban profilaxis y terapia inadecuadas. La paciente es de aspecto des-

* Laboratorio Bacteriológico, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

** Sección de Odontología, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

*** Servicio de Dermatología, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

nutrido y anémico. De acuerdo al cuadro clínico general de la región bucofacial, el Servicio de Odontología la internó en el Servicio de Cirugía con el diagnóstico de "fístulas paramandibulares de posible origen dentario".

La paciente refirió haber tenido fístulas en el lado derecho de la cara, dolor intenso, continuo, de tipo taladrante, localizado sobre todo en el lado izquierdo, que se puede comparar con los dolores que dan las complicaciones de cuarto grado de caries dentarias. Todo este cuadro agudo tenía, a la fecha de ingreso y según datos de la paciente, ocho meses de evolución. Hace seis años presentó un cuadro fistuloso en la región del mentón que dejó cicatriz bastante visible (fig. 4).

En el mes de diciembre de 1959 presentó, por un período de seis días, intensos dolores localizados en el arco dentario, que se acompañaron con la formación de un pequeño nódulo indurado, algo doloroso, que dificultaba la masticación y deglución. Dichos síntomas se mantuvieron más o menos invariables por varios días y en enero del presente año los síntomas se agudizaron especialmente el dolor y la tumefacción. Durante dos meses estuvo con la cara inflamada en la región lateral izquierda, proyectándose también sobre la región parietal con persistencia de nódulos indurados, fístulas y una regular cantidad de pus que salía intermitentemente a través de los canales fistulosos (fig. 1).

En el Servicio de Odontología se procedió a la extracción total de todos los restos radiculares y a la toma de pus de las regiones geniana y parietal izquierdas para el correspondiente estudio bacteriológico y micológico. En el Servicio de Cirugía se hizo el drenaje respectivo.

El estudio radiológico no demostró zonas de osteomielitis o de lesión ósea. Todo el cuerpo mandibular estaba perfectamente sano.

De los exámenes adicionales de laboratorio, los hemogramas practicados dieron valores entre 2,5 y 3 millones de eritrocitos por mm^3 con anisocitosis e hipocromía y una leucocitosis de 11.000 a 20.000 células por mm^3, con neutrofilia de 76 a 84 por ciento. La velocidad de sedimentación estaba aumentada (36 mm corregida según Wintrobe y un hematocrito de 26 cc / 100 cc). La intradermorreacción a la tuberculina dió resultado negativo.

Después del drenaje quirúrgico las lesiones comenzaron a cicatrizar con persistencia de la tumefacción pariental izquierda y discreto trismus temporomandibular (fig. 5). Se inició entonces tratamiento con Griseofulvina (Schering) administrádosele 2 tabletas tres veces al día con perfecta tolerancia. A los quince días (mayo de 1960) habiéndose apreciado gran mejoría en la lesión, se hizo nueva investigación de laboratorio sin que se pudiera evidenciar el hongo, en el escaso material obtenido por expresión, por medio de frotis directos y cultivos. El tratamiento se continuó con 4 tabletas al día durante tres semanas más y fue suspendido cuando la lesión se apreciaba perfectamente cicatrizada.

ESTUDIO MICOLOGICO Y BACTERIOLOGICO.—En nuestro estudio microscópico del primer material purulento no encontramos el hongo, pero observamos cocos Gram positivos que cultivaron y se identificaron como *Staphylococcus*

aureus coagulasa positiva. Después de un período de tratamiento con terramicina, fue enviado al Laboratorio nuevo material purulento para ser examinado, en el cual encontramos gran cantidad de filamentos ramificados Gram positivos, no ácido alcohol resistentes, con tendencia a la fragmentación en cortos segmentos pleomórficos y con un grosor menor de una micra (fig. 6). En vista de estos hallazgos pensamos en la posibilidad de una actinomicosis y tratamos de buscar los típicos gránulos azufrados, sin suceso. Sin embargo del mismo material hicimos frotis seriados que coloreados con la técnica de Gram, mostraron, además de filamentos gram positivos, masas filamentosas entrecruzadas que interpretamos como pequeños gránulos en formación (fig. 7).

Este material fue cultivado en infusión de cerebro y corazón con y sin agar, agar proteosa Nº 3 enriquecido con hemoglobina y sangre desfibrinada de conejo, y caldo nutritivo, todos de la casa Difco. Estos cultivos se incubaron a 37º C a una tensión de oxígeno desminuída. También se cultivó en medio de tioglicolato con incubación a 37º C.

En el agar infusión de cerebro y corazón semisólido, después de cuatro a cinco días aparecieron colonias blancas de diversos tamaños, rugosas, distribuídas en todo el medio, presentando al examen microscópico filamentos ramificados y cortos segmentos Gram positivos no ácido resistentes, correspondiendo bien su morfología a *Actinomyces bovis* (fig. 3).

En el caldo infusión de cerebro y corazón el hongo creció desarrollando colonias de aspecto denso y color blanco cremoso en el fondo de los tubos, permaneciendo el resto del medio transparente; cuando se agitaban los tubos, las colonias se distribuían en todo el medio líquido (fig. 2). Al microscopio se observaron dichas colonias formadas por abundantes filamentos micelianos Gram positivos, muy ramificados y fragmentados. Los segmentos más cortos eran muy pleomórficos y semejaban a la morfología microscópica de los cultivos de *Corynebacterium diphtheriæ* (fig. 8). En los medios de tioglicolato y caldo nutritivo simple el crecimiento del hongo fue deficiente.

Observamos que la fragmentación del micelio se intensificó en los pasajes sucesivos y a la vez aumentó el pleomorfismo como dijimos anteriormente, observándose casi exclusivamente formas cortas bacilares que semejan a los elementos difteroides.

COMENTARIO

Estudios de otros investigadores han demostrado que *A. bovis* se puede presentar como un saprófito en la boca humana. EMMONS (3) aisló cepas de *A. bovis* de amígdalas de personas aparentemente normales. MILLER y DRAKE (5) aislaron cepas de *A. bovis* de bocas normales, que resultaron ser idénticas en sus características morfológicas, antigénicas y en sus requerimientos nutritivos con una cepa patógena de *A. bovis*. Estos hallazgos hacen pensar que la fuente de infección en la actinomicosis es endógena.

En el caso aquí estudiado, la paciente presentaba caries en sus dientes, así como abscesos en los alveolos dentarios en donde posiblemente se localizó

primariamente el hongo, para luego invadir los tejidos vecinos y producir las lesiones anteriormente descritas.

La presencia de caries y en general la falta de profilaxis dental se han citado en muchos casos como factores predominantes en infecciones actinomicósicas (1).

HOLM (4) llama la atención acerca de bacterias encontradas en asociación con gránulos actinomicóticos en lesiones cerradas. El papel que juegan estas bacterias en la patogénesis de la actinomicosis es aun desconocido; sin embargo, NEGRONI y DAGLIO (6) demostraron *in vitro* un fenómeno de satelitismo, entre una cepa de *A. israeli* y *Streptococcus sp.* aisladas de un caso de actinomicosis cervicofacial, en el cual el hongo producía una sustancia indispensable para la nutrición de la bacteria.

CONANT *et al.* (1) consideran que el tratamiento quirúrgico en la actinomicosis es esencial para lograr una mejoría clínica de la enfermedad.

En el caso aquí presentado se observó que el drenaje quirúrgico de las fístulas, extracción radical de los dientes, y tratamiento con griseofulvina determinó una notable mejoría en el cuadro clínico. Las fístulas cerraron y entraron en un proceso de cicatrización, disminuyó la tumefacción y desapareció el dolor.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Dr. Rodrigo Zeledón algunas sugerencias y la revisión del manuscrito.

RESUMEN

Se presentan los hallazgos clínicos, bacteriológicos y micológicos del primer caso costarricense de actinomicosis cervicofacial, producido por *A. bovis* y tratado satisfactoriamente con Griseofulvina.

SUMMARY

The first Costa Rican case of cervicofacial actinomycosis caused by *A. bovis* is presented from the clinical, bacteriological and mycological standpoints. The case was treated successfully with Griseofulvin (Schering).

BIBLIOGRAFIA

1. CONANT, N. F., D. T. SMITH, R. D. BAKER, J. L. CALLAWAY & D. S. MARTIN
1954. *Manual of Clinical Mycology.* 2ª ed., XII + 456 pp., W. B. Saunders Co. Philadelphia.

2. DECHAUME M., G. CARLIER, M. GOUDAERT & H. BEERENS.
1955. Actinomycosis cervicofacial, problems, clinical and bacteriologic aspects, *Presse Méd.*, 63: 448-452.

3. EMMONS, C. W.
1938. The isolation of *Actinomyces bovis* from tonsillar granules. *Publ. Health Rep.,* 53: 1967.

4. HOLM, P.
1950. Studies on the aetiology of human actinomycosis. I: The "Other Microbes" of actinomycosis and their importance. *Acta path. et microbiol. Scandinava,* 27: 736. (cit. en 1).

5. MILLER, N. G & C. H. DRAKE
1951. Experimental actinomycosis. *Mycopathol. et Mycol. applicata,* 6 (1): 28-37.

6. NEGRONI, P. & C. A. N. DAGLIO.
1949. Satelitismo microbiano: *Actinomyces israeli-Streptococcus sp. Mycopathologia,* 4 (4): 327-329.

Fig. 1: Actinomicosis cervicofacial. Nótese el edema que se proyecta hasta la región parietal.

Fig. 2: *Actinomyces bovis*. Cultivo en caldo infusión de cerebro y corazón.

Fig. 3: *Actinomyces bovis*. Cultivo en agar infusión de cerebro y corazón.

Fig. 4: Actinomicosis cervicofacial. Obsérvese las fístulas cicatrizadas de la región mandibular derecha y el mentón.

Fig. 5: Actinomicosis cervicofacial. Aspecto que presentaba la lesión después del drenaje quirúrgico.

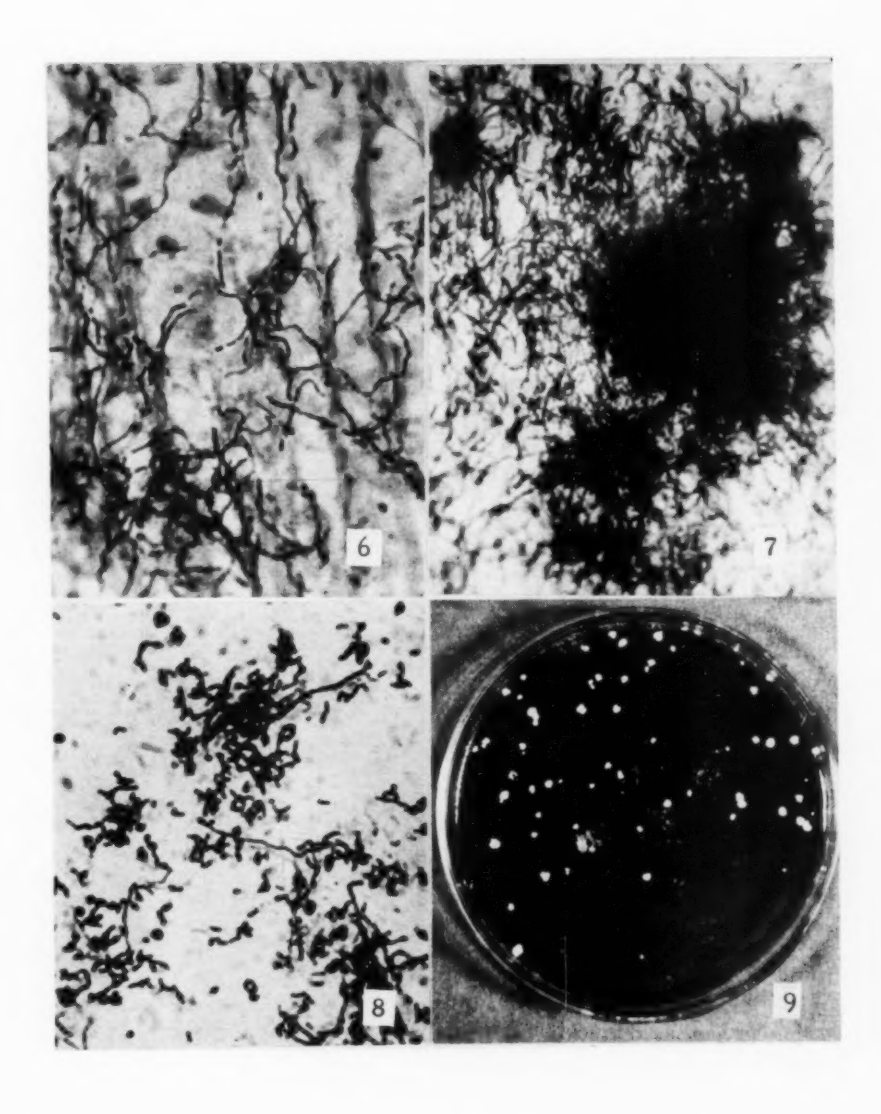

bovis
4/4/60
A. bovis
A. bovis
1
2
3
4
5

Fig. 6: *Actinomyces bovis*. Filamentos ramificados, Gram positivos, en el pus de las lesiones (1000 ×).

Fig. 7: *Actinomyces bovis*. Material purulento de las lesiones, obsérvese la formación de gránulos azufrados (1000 ×).

Fig. 8: *Actinomyces bovis*. Frotis del cultivo en caldo infusión de cerebro y corazón, obsérvese el marcado pleomorfismo del hongo (1000 ×).

Fig. 9: *Actinomyces bovis*. Cultivo en agar sangre.


6
7
8
9

Rev. Biol. Trop., 8(2):165-179, 1960

Estudio de las deficiencias de nitrógeno, potasio, magnesio, boro y manganeso, en plantas de café (Coffea arabica var. typica)

por

J. F. Carvajal C.*

(Recibido para su publicación el 4 de agosto de 1960)

La sintomatología que muestran las plantas que crecen en un medio deficiente en elementos nutritivos, ha sido objeto de numerosas investigaciones al través de los años, por constituir, un aporte de gran valor para resolver los problemas de abonamiento.

En 1959 CHAVERRI y CARVAJAL (3) publicaron los resultados obtenidos al someter plantas de café, a dietas carentes de fósforo, calcio, hierro y azufre. Luego en el mismo año MÜLLER (7) escribió acerca de la sintomatología de algunas deficiencias minerales en el campo.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar los síntomas de las deficiencias de nitrógeno, potasio, magnesio, boro y manganeso, en arbustos de café (*Coffea arabica* var. *typica*) en soluciones nutritivas.

MATERIAL Y METODOS

Arbustos de café de un año de edad que crecían en el campo, fueron trasplantados a potes metálicos de veinte litros, cuyo interior estaba recubierto de una gruesa capa de pintura inerte; los sistemas radicales de cada una de las plantas antes de ser colocadas en el pote fueron lavados para eliminar la tierra. El experimento consistió en seis tratamientos repetidos tres veces, utilizando una planta por cada repetición. La composición de las soluciones utilizadas aparece en el Cuadro 1. En todos los casos se usó solución de Hoagland (5) ajustada semanalmente a pH 6. Los elementos mayores se añadieron cada mes al

---

* Laboratorio de Investigaciones Agronómicas, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

renovar las soluciones y los menores a intervalos de diez días; un compresor automático mantuvo el medio continuamente aereado.

Una vez obtenidos los síntomas de deficiencia de cada uno de los elementos en estudio, se procedió a dividir la parte aérea de la planta a partir de la mitad del tallo en dos secciones (superior e inferior), y a separar las hojas para análisis. Al colectar las muestras se seleccionaron hojas jóvenes y adultas deficientes y sanas.

Para el análisis químico de las muestras se emplearon los mismos métodos utilizados por CHAVERRI y CARVAJAL (3).

RESULTADOS

Como era de esperar, las plantas que se mantuvieron en la solución completa mostraron el mejor desarrollo durante el transcurso de la investigación. Las hojas se mostraron de buen tamaño y presentaron en todo momento un color verde oscuro brillante, y el sistema radical fue abundante y vigoroso.

La deficiencia de boro fue la primera en manifestarse; esta apareció mes y medio después de iniciado el experimento. Le siguió la deficiencia de nitrógeno que se notó dos semanas más tarde. Las plantas que crecieron en soluciones sin potasio, magnesio y manganeso mostraron las primeras características anormales cuatro meses después de haber empezado los tratamientos.

A continuación se describen los síntomas de las defiencias que se observaron para cada uno de los elementos en estudio.

DEFICIENCIA DE NITRÓGENO. El primer síntoma que se observó en las plantas deficientes en nitrógeno fue un amarillamiento de la vena central de las hojas viejas, seguido de una clorosis en las áreas adyacentes; esto se notó también en hojas jóvenes de poco desarrollo, que además presentaron los bordes corrugados hacia el haz. Conforme la deficiencia progresaba toda la planta se tornó clorótica; las hojas adultas perdieron su condición de erectas pero sin desprenderse y las venas retuvieron un color amarillo verdoso (fig. 1).

Después de algún tiempo las hojas viejas se tornaron anaranjadas con un tinte rojizo cerca del borde. Esta coloración progresó con el tiempo de adentro hacia afuera. A menudo algunas hojas presentaron áreas color café de tejido necrosado en los bordes y en el ápice que se desprendieron con suma facilidad. El tejido leñoso de las bandolas (ramas laterales) apareció de un color café rojizo; esta condición se extendió desde el eje central hasta el último par de hojas que presentaba color anaranjado. El sistema radical de estas plantas fue pequeño, poco denso, y de un color grisáceo (fig. 10).

DEFICIENCIA DE POTASIO. Los síntomas de la deficiencia de potasio se presentaron primero en las hojas adultas, en forma de una banda amarillenta más o menos ancha cerca del borde, seguida de otra verde claro que dejó ver áreas pequeñas más oscuras de bordes indefinidos. Después de algún tiempo estas mostraron las venas amarillas y áreas necróticas café rojizo que se extendie-

CUADRO 1

Composición química de las soluciones nutritivas

Solución	Compuesto	PARTES POR MILLON											
		N	P	K	Ca	Mg	S	"Sequestrene. NaFe"	H_3BO_3	$MnCl_2$	$ZnSO_4$	$CuSO_4$	H_2MoO_4
								Fe	B	Mn	Zn	Cu	Mo
Completa	KH_2PO_4 KNO_3 $Ca(NO_3)_2$ $MgSO_4$	70 140	30	39 195	200	48	64	5	0,5	0,5	0,05	0,02	0,01
— N	K_2SO_4 $MgSO_4$ $Ca(H_2PO_4)_2$ $CaSO_4$	—	30	195	20 80	48	80 64 64	5	0,5	0,5	0,05	0,02	0,01
— K	$Ca(NO_3)_2$ $MgSO_4$ $Ca(H_2PO_4)_2$	140	30	—	200 20	48	64	5	0,5	0,5	0,05	0,02	0,01
— Mg	$Ca(NO_3)_2$ KNO_3 KH_2PO_4 K_2SO_4	112 84	30	234 39 117	160	—	96	5	0,5	0,5	0,05	0,02	0,01
— B	KH_2PO_4 KNO_3 $Ca(NO_3)_2$ $MgSO_4$	70 140	30	39 195	200	48	64	5	—	0,5	0,05	0,02	0,01
— Mn	KH_2PO_4 KNO_3 $Ca(NO_3)_2$ $MgSO_4$	70 140	30	39 195	200	48	64	5	0,5	—	0,05	0,02	0,01

ron de los bordes hacia el interior de la lámina, principalmente hacia el ápice (fig. 4), sobresaliendo a veces zonas verdes en alto relieve; estas se tornaron más tarde color café brillante, permaneciendo siempre en relieve. En este estado las hojas se desprendían con facilidad. En algunos casos se presentó necrosis en los bordes de las hojas limitada por un halo verde amarillento (fig. 3).

Las hojas jóvenes presentaron clorosis leve con las venas verde oscuro. El sistema radical desarrolló poco, presentándose de color café (fig. 11).

DEFICIENCIA DE MAGNESIO. La deficiencia de magnesio se notó primero en las hojas adultas de la parte inferior de la planta, avanzando más tarde hacia las más jóvenes. Las zonas comprendidas entre las venas perdieron el color verde intenso y se tornaron algo cloróticas; asimismo las venas exhibieron un color verde claro.

Con el transcurso del tiempo las áreas comprendidas entre las venas se tornaron amarillo paja y perdieron el brillo; por último estas aparecieron de un color bronceado que se extendió a todo el limbo, la vena central y las secundarias presentaron una zona verde adyacente (fig. 5); las hojas perdieron su condición de erectas y en la mayoría de los casos retuvieron el color verde oscuro en los bordes del ápice. Ocasionalmente se observó que algunas hojas con áreas de color amarillo junto a las venas se desprendían con faciildad; otras presentaron puntos necróticos de color bronceado diseminados en todo el limbo (fig. 6). El sistema radical desarrolló poco y al avanzar la deficiencia las raíces jóvenes mostraron necrosis generalizada (fig. 12).

DEFICIENCIA DE BORO: Las plantas deficientes en boro mostraron los primeros síntomas en las hojas jóvenes; estas presentaron áreas necróticas pequeñas de color café rojizo y de forma angular, cuyo estado incipiente se nota mejor en el envés; se tornaron flácidas y perdieron el brillo; cuando la deficiencia avanzó, aparecían corrugadas de consistencia coriácea y cónvacas con los bordes deformados. Poco tiempo después de haberse notado este síntoma, ocurrió la muerte de las yemas terminales. La muerte de estas estimuló el brote de las yemas más cercanas presentándose entonces la condición de "palmilla" que comúnmente se observa en las plantaciones deficientes de este elemento. Una vez que se añadió boro en pequeñas cantidades al medio (0,125 ppm), las hojas jóvenes se tornaron cloróticas, permaneciendo las venas verdes (fig. 2); aquellas que estaban completamente desarrolladas, presentaron una suberización de la vena central y las secundarias; esta condición fue más notoria en el envés. En hojas adultas se observó una coloración verde claro ligeramente mate, que se extendía del ápice hacia la base, abarcando aproximadamente un tercio de la hoja; el borde interno del área afectada era lobulado. El sistema radical se notó poco desarrollado (fig. 13).

DEFICIENCIA DE MANGANESO. Las plantas que se desarrollaron en soluciones carentes de manganeso, fueron las más semejantes a las que crecieron en la solución completa; las hojas jóvenes aparecieron de mayor tamaño que las

normales, y mostraron áreas verde claro de forma lobular localizadas especialmente hacia los bordes y el ápice; se notó además una zona verde oscuro paralela a las venas (fig. 7). El color y el desarrollo del sistema radical fue muy semejante al de las plantas que se desarrollaron en la solución completa (fig. 14).

ANALISIS FOLIAR

Muestras foliares de cada una de las plantas de este experimento fueron analizadas químicamente para determinar su contenido de nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, calcio, azufre, hierro, boro y manganeso. En el Cuadro 2 aparecen los resultados obtenidos mediante el análisis químico.

Las plantas que se mantuvieron en soluciones carentes de nitrógeno, acumularon más azufre y hierro que las mantenidas en la solución completa; es posible que el aumento del primero sea debido al mayor suministro de este elemento (Cuadro 1). En los primeros y segundos pares de hojas se registró 0,56 por ciento de azufre y 141 ppm de hierro. El contenido de manganeso fue relativamente bajo. El nitrógeno fluctuó entre 1,31 y 1,69 por ciento. De acuerdo con investigaciones anteriores (2) estos porcentajes corresponden a un contenido bajo de nitrógeno.

Las muestras provenientes de plantas deficientes en potasio presentaron cantidades altas de magnesio (0,50 por ciento), de fósforo (0,32 por ciento) y manganeso (270 ppm). El contenido de potasio fue bastante bajo tanto en las hojas jóvenes como en las adultas (promedio 0,70 por ciento); las hojas que se desprendieron de la planta mostraron una cantidad aun menor de potasio (0,48 por ciento).

Las plantas que se desarrollaron en las soluciones carentes de magnesio presentaron cantidades de este elemento en el follaje del orden de 0,03 por ciento. Las hojas inferiores mostraron un contenido un poco más alto que las de la parte superior. La carencia de magnesio favoreció la acumulación de potasio y de azufre (en los cuartos pares del medio inferior aparecieron concentraciones hasta de 4,13 y 0,40 por ciento respectivamente); cabe hacer notar que las cantidades de ambos nutrientes que recibieron estas plantas, fueron mayores que las suministradas a las plantas en solución completa (Cuadro 1).

La deficiencia de manganeso que se logró provocar, no fue severa como se observa algunas veces en condiciones de campo. La concentración de este elemento fue tan baja que no pudo medirse por el método de PEECH (8). El contenido de calcio y nitrógeno de estas plantas fue relativamente bajo.

DISCUSION

Algunos de los síntomas que se describen en el presente trabajo difieren de lo que han encontrado otros investigadores (1, 4, 6, 7):

En la deficiencia de potasio existe alguna discrepancia; la única característica común es la necrosis de los bordes de las hojas adultas. Como se observa en la fig. 4 el síntoma se presentó además en la forma de áreas necróti-

CUADRO 2

Composición química de las muestras obtenidas para análisis. Cada cifra representa el promedio de una determinación hecha en duplicado

Tratamiento	Parte de la planta*	PROCEDENCIA	PORCENTAJE N	P	K	Ca	Mg	S	ppm Fe	Mn	B
Nutrición completa	Superior	Primeros pares	3,93	0,18	2,73	0,87	0,23	0,22	71	87	49
		Segundos pares	3,04	0,14	2,46	0,97	0,23	0,21	66	98	53
		Cuartos pares	2,66	0,11	2,16	1,84	0,23	0,16	83	119	66
		6º y 7º pares	2,60	0,10	2,36	2,60	0,23	0,23	89	182	96
		8º, 9º y 10º pares	2,34	0,14	2,64	2,56	0,27	0,24	114	152	117
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	2,75	0,11	1,78	1,02	0,25	0,22	73	110	84
	Inferior	Primeros pares	3,28	0,18	2,50	2,05	0,24	0,21	66	140	58
		Segundos pares	3,11	0,15	2,68	2,46	0,24	0,24	66	127	74
		Cuartos pares	3,13	0,15	2,58	1,55	0,23	0,21	77	223	102
		8º, 9º y 10º pares	2,67	0,17	3,01	2,20	0,30	0,26	153	197	48
Carenate de Nitrógeno	Diversas Partes	Primeros y segundos pares con síntomas severos	1,69	0,05	2,68	0,61	0,33	0,56	141	62	103
		Cuartos pares con síntomas muy acentuados	1,35	0,05	1,55	0,82	0,31	0,53	245	54	63
		Hojas viejas	1,31	0,10	2,70	1,74	0,39	0,50	321	40	96
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	1,61	—	—	—	—	—	—	—	—
		Primeros y segundos pares con síntomas	1,30	0,13	3,23	0,77	0,27	0,32	129	41	117
		Cuartos pares con síntomas severos	1,30	0,12	2,93	1,02	0,24	0,35	156	18	135
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	1,26	—	—	—	—	—	—	—	—
Carente de Potasio	Superior	Priemros pares. Algunos muestran una cierta clorosis	2,60	0,18	1,15	1,23	0,29	0,24	82	125	—
		Segundos pares. Algunos con síntomas característicos	3,14	0,22	0,50	1,74	0,43	0,28	60	140	97
		Cuartos pares, con síntomas	2,81	0,14	1,60	1,38	0,26	0,20	96	122	52
		Sextos pares, con síntomas	2,91	0,30	0,60	1,74	0,49	0,21	72	270	143
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	2,69	0,16	1,50	0,61	0,42	0,12	83	118	—

	Inferior	Primeros pares, bien desarrollados con una cierta clorosis	3,27	0,31	0,70	0,94	0,49	0,28	72	200	82
		Segundos pares, con síntomas	3,13	0,30	0,80	2,04	0,46	0,21	49	210	100
		Cuartos pares, algunos con síntomas	2,98	0,32	0,70	2,04	0,50	0,22	78	250	107
		Pares 8º, 9º y 10º, algunos con síntomas	1,92	0,31	0,80	2,66	0,37	0,16	179	373	149
		Hojas de diversas partes de la planta, desprendidas, con síntomas	2,96	0,20	0,48	2,35	1,16	—	—	—	—
Carente de Magnesio	Superior	Segundos pares, de apariencia normal	2,38	0,15	3,42	1,02	0,04	0,28	69	112	103
		Cuartos pares, con síntomas	3,26	0,15	3,65	1,50	0,02	0,37	97	160	69
	Inferior	Segundos pares, de color normal	3,34	0,16	3,48	1,23	0,04	0,30	84	81	27
		Cuartos pares, con síntomas	3,05	0,16	4,13	2,35	0,02	0,40	107	223	92
		Pares 8º, 9º y 10º, con ligeros síntomas	2,73	0,18	3,33	1,59	0,06	0,30	131	143	87
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	2,73	0,08	2,05	0,51	0,05	0,18	81	140	—
Carente de Manganeso	Superior	Primeros pares	2,77	0,16	2,40	0,82	0,25	0,15	72	**	46
		Segundos pares	2,68	0,13	2,00	0,82	0,25	0,19	128	"	50
		Terceros pares, con síntomas incipientes	2,33	0,11	2,00	0,72	0,21	0,17	75	"	53
		Cuartos pares, con síntomas	2,45	0,11	2,30	1,23	0,21	0,14	109	"	53
		Sextos pares, algunos con síntomas	2,81	0,12	2,40	1,79	0,13	0,16	106	"	64
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	2,13	0,10	1,50	0,82	0,26	0,10	90	"	81
	Inferior	Primeros pares	2,55	0,11	2,20	1,18	0,26	0,17	71	"	47
		Segundos pares	2,61	0,16	2,30	1,23	0,13	0,18	68	"	47
		Terceros pares	2,63	0,16	2,40	1,33	0,21	0,19	98	"	54
		Cuartos pares, algunos con síntomas	2,59	0,18	2,40	1,43	0,25	0,22	117	"	66
		Sextos pares, normales	2,63	0,18	2,80	2,20	0,25	0,19	183	18	81
Carente de Boro	Superior	Primeros pares (de palmillas) con síntomas	3,34	0,17	2,68	1,13	0,20	0,25	64	127	24
		Segundos pares (de palmillas) con síntomas	3,32	0,19	2,65	1,23	0,23	0,26	62	152	29
		Los dos últimos pares (de palmillas) de toda la planta	—	0,20	2,87	2,76	0,31	0,26	194	271	67
		Hojas adultas	2,70	0,21	2,57	1,79	0,27	0,23	134	176	78
		Tejido de madera de los últimos entrenudos	—	—	—	—	—	—	—	—	58
	Inferior	Primeros pares (de palmillas) con síntomas	3,40	0,17	2,80	1,18	0,25	0,26	61	134	20
		Segundos pares (de palmillas) con síntomas	3,09	0,19	2,72	1,13	0,23	0,22	81	123	23

* En el momento de tomar las muestras cada planta se dividió en dos partes iguales ,superior e inferior. Las muestras foliares fueron tomadas del 1º al 10º par de hojas.

** El análisis colorimétrico no demostró la presencia del elemento al usar metaperyodato de potasio como oxidante.

cas irregulares sobresaliendo algunas zonas verdes en alto relieve de forma y tamaño variables.

La deficiencia de magnesio la describen FRANCO y MENDES (4) como una clorosis irregular que luego se extiende a toda la hoja. CIBES y SAMUELS (1) la presentan como manchas necróticas localizadas cerca de los bordes y el ápice, que luego coalecen formando áreas grandes color paja, con el espacio entre las venas más o menos verde. La deficiencia de magnesio que se observa en la fig. 6 aparece en forma de áreas necróticas pequeñas diseminadas en todo el limbo. En la comunicación de LOUÉ (6) la deficiencia de magnesio está descrita desde el estado incipiente hasta el severo, y presenta una sintomatología bastante similar a la que se describe en este trabajo. La diferencia puede deberse al material experimental, ya que Loué trabajó con plantas de *Coffea canephora* var. *robusta*.

En las plantas deficientes en boro se notó clorosis en algunas de las hojas adultas; corroborando la descripción hecha por PÉREZ (9). Este síntoma no fue observado por MÜLLER (7). Además de la clorosis en las hojas adultas se notó clorosis en el espacio comprendido entre las venas de algunas hojas jóvenes (fig. 2). Es interesante hacer notar que la composición química de estas hojas fue normal con respecto a los otros elementos (Cuadro 2).

El síntoma de la deficiencia de manganeso que se logró provocar no fue severo, pero sí representativo de la deficiencia en estado incipiente en condiciones de campo (fig. 7). Es muy posible que las sales que se usaron para preparar las soluciones nutritivas estuvieran contaminadas con manganeso.

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su gratitud a la planta mezcladora de fertilizantes "Abonos Superior Ltda.", cuyo aporte económico hizo posible la impresión de las láminas a colores.

RESUMEN

Arbustos de café de un año de edad (*Coffea arabica* var. *typica*), fueron trasplantados a soluciones nutritivas carentes en nitrógeno, potasio, magnesio, manganeso y boro.

Los síntomas de deficiencia desarrollados se corroboraron por medio de análisis foliar.

Las plantas que crecieron en las soluciones deficientes en nitrógeno mostraron muy poco desarrollo y una fuerte clorosis, que se manifestó con mayor intensidad en las hojas adultas. El contenido de hierro y azufre en el follaje de estas plantas fue alto, mientras que el de manganeso fue relativamente bajo.

La deficiencia de potasio se manifestó en las hojas adultas a manera de áreas necróticas diseminadas en todo el limbo o localizadas en los bordes de las hojas. El contenido de magnesio, fósforo y manganeso fue alto.

La carencia de magnesio provocó los siguientes síntomas en el follaje: zonas cloróticas que luego se tornaron bronceadas en las áreas comprendidas entre las venas. Ocasionalmente se presentaron hojas con áreas necróticas pequeñas distribuídas en todo el limbo. En el follaje de estas plantas se acumularon cantidades altas de potasio y azufre.

En las plantas deficientes en boro se notó la muerte de las yemas terminales seguida de un estímulo de las yemas más cercanas. Las hojas jóvenes que mostraron clorosis conservaron la nervadura verde; se notó suberización en la vena central y las secundarias.

La deficiencia de manganeso se manifestó en las hojas jóvenes en forma de áreas verde claro de forma lobular, localizadas principalmente hacia los bordes y el ápice. En las hojas de estas plantas se acumuló poco calcio y nitrógeno.

SUMMARY

One-year old coffee trees (*Coffea arabica* var. *typica*) grown in the field were transplanted to the greenhouse to nutrient solutions lacking nitrogen, potassium, magnesium, boron, and manganese.

The deficiency symptoms were corroborated by leaf analysis.

Nitrogen-deficient plants were stunted and showed strong chlorosis in the older leaves. Iron and sulphur content in these leaves was high and manganese relatively low.

Potassium deficiency in the older leaves was characterized either by the development of a necrotic strip at the margin of the leaves or by necrotic areas scattered over the leaf-blade. Potassium deficient plants were high in magnesium, phosphorus, and manganese.

The lack of magnesium caused the following outstanding symptoms in the older leaves: chlorotic areas between the veins which turned brownish after some time. Occasionally some of the leaves showed small necrotic areas all over the leaf-blade. Deficient leaves were high in potassium and sulphur.

Die-back was noticed in boron-deficient plants, followed by a stimulation of the nearest axillary buds. Some of the younger leaves showed a fine network of dark-green veins and a chlorotic background; suberization was observed on the central and secondary veins.

The manganese deficiency appeared as light-green lobed-shaped areas located chiefly at the margins and tips of the younger leaves. Manganese-deficient trees appeared low in calcium and nitrogen.

BIBLIOGRAFIA

1. CIBES, H. & G. SAMUELS
1955. Mineral-deficiency symptonms displayed by coffe trees grown under controlled conditions. *Puerto Rico Agr. Exp. Sta.*, Río Piedras. Tech. paper 14, 21 pp.

2. CHAVERRI, G., E. BORNEMISZA & F. CHAVES
1957. *Resultados del análisis foliar del cafeto en Costa Rica.* Costa Rica. Servi-

cio Técnico Interamericano de Cooperación Agrícola (STICA). Información Técnica N° 3. 39 pp.

3. CHAVERRI, G. & J. F. CARVAJAL
1959. *Síntomas de deficiencia de los elementos fósforo, calcio, azufre y hierro, en el cafeto producidos en invernadero.* Costa Rica. Servicio Técnico Interamericano de cooperación Agrícola (STICA). Información Técnica N° 8, 14 pp.

4. FRANCO, C. M. & H. C. MENDES
1949. Síntomas de deficiencias minerais no cafeeiro. *Bragantia* 9: 165-173.

5. HOAGLAND, D. R. & D. I. ARNON
1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agr. Exp. Sta.*, Circ. 347, 32 pp.

6. LOUÉ, A.
1957. *Studies on the Inorganic Nutrition of the Coffee Tree in the Ivory Coast.* International Potash Institute. Berne, 68 pp.

7. MÜLLER, L. E.
1959. *Algunas deficiencias minerales comunes en el cafeto (Coffea arabica L.) Turrialba, Costa Rica.* Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. Boletín Técnico N° 4, 40 pp.

8. PEECH, M.
1945. Determination of exchangeable cations and exchange capacity of soils. Rapid micromethods utilizing centrifuge and spectrophotometer. *Soil Sci.* 59: 25-38.

9. PÉREZ, V. M.
1957. *Algunas deficiencias minerales del cafeto en Costa Rica.* Costa Rica. Servicio Técnico Interamericano de Cooperación Agrícola (STICA). Información N° 2, 27 pp.

Fig. 1. Hojas de café con deficiencia de nitrógeno.

Fig. 2. "Palmilla" característica de la deficiencia de boro.

Fig. 3. Hojas deficientes en potasio con necrosis en el borde.

Fig. 4. Hojas deficientes en potasio mostrando áreas necróticas diseminadas.



1
2
3
4

Fig. 5. Deficiencia de magnesio; las hojas muestran clorosis en los espacios comprendidos entre las venas.

Fig. 6. Deficiencia de magnesio; hojas con puntos necróticos diseminados.

Figs. 7 y 8. Hojas con deficiencia de manganeso: la hoja inferior de la fig. 7 corresponde al síntoma que se obtuvo en el invernadero. Las restantes fueron tomadas en el campo de plantas deficientes.

5

7

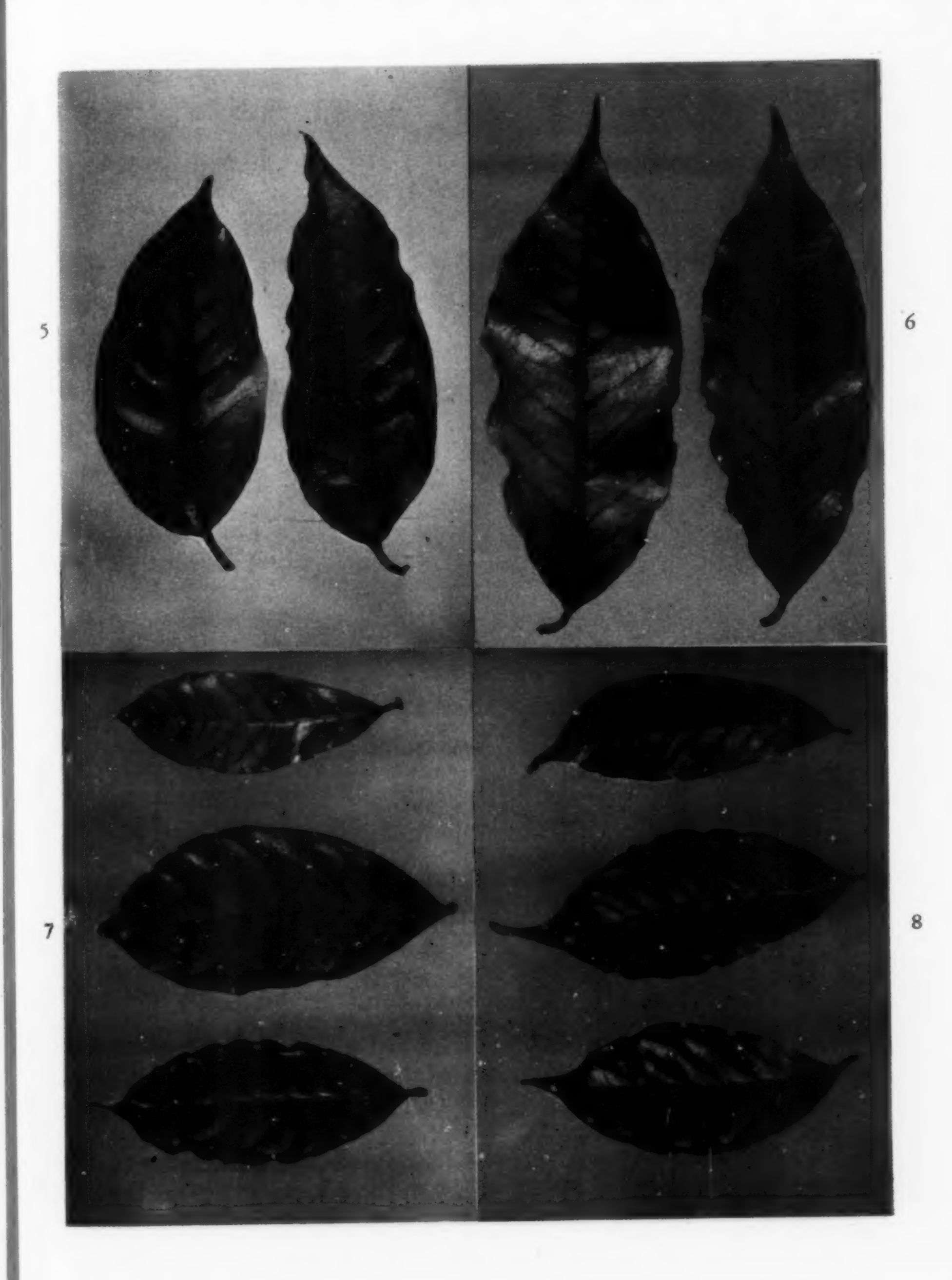
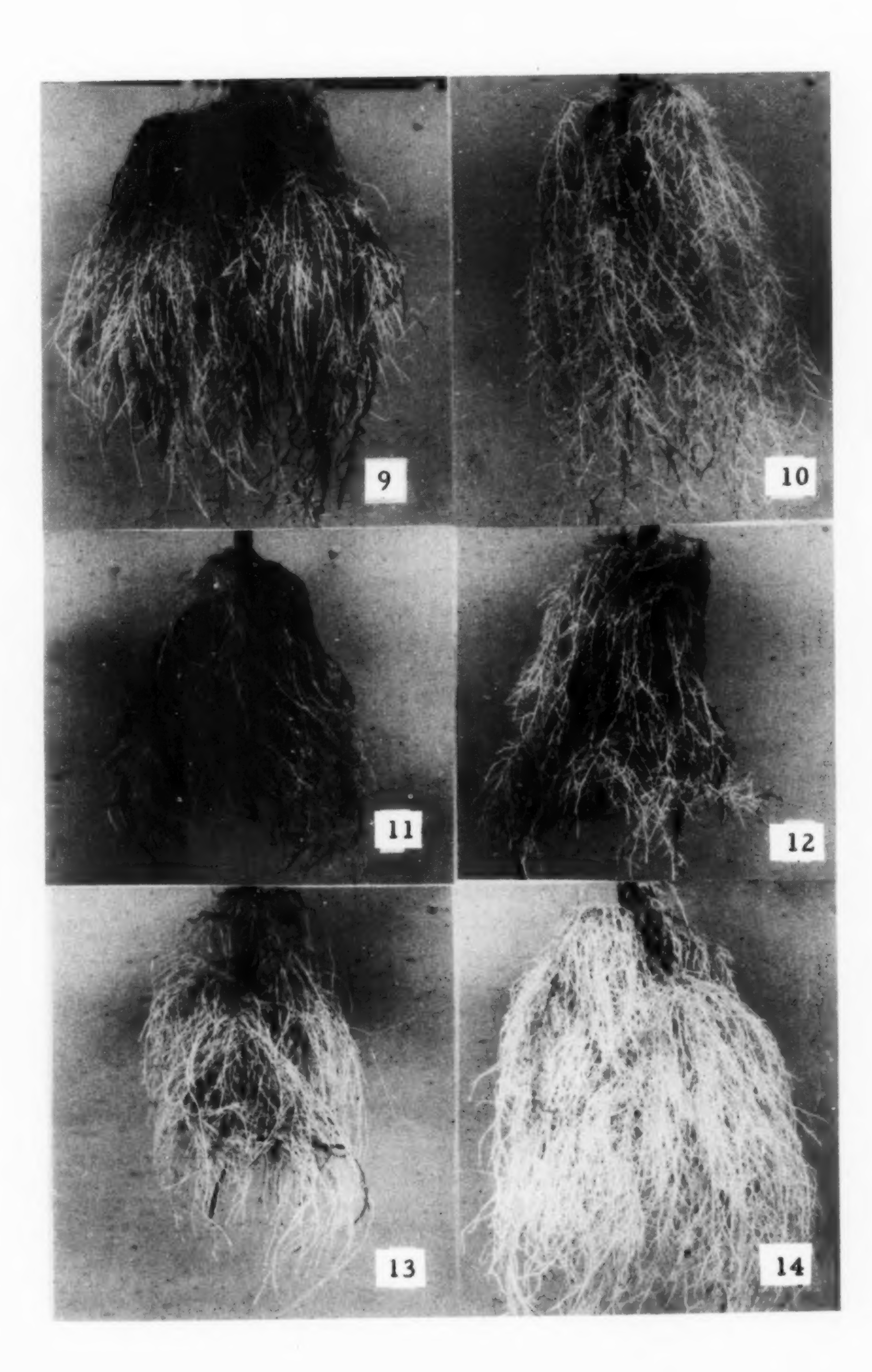

5
6
7
8

Fig. 9. Sistema radical proveniente de una planta crecida en solución completa.

Figs. 10-14. Sistemas radicales de plantas deficientes en: nitrógeno, potasio, magnesio, boro y manganeso, respectivamente.


9
10
11
12
13
14

Rev. Biol. Trop., 8(2):181-195, 1960

Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. IV. Effect of metabolic inhibitors on the respiration*

by

Rodrigo Zeledón**

(Received for publication August 25, 1960)

Metabolic inhibitors in the study of hemoflagellates have been useful in demonstrating important physiological differences among the species. VON BRAND (3, 4), reviewed the literature up to 1951, and classified the blood forms of the trypanosomes parasitic in mammals by their reactions to certain metabolic inhibitors. Von Brand's groups corresponded approximately to the groups of the biological and morphological classification of HOARE (14). More recent contributions are those of MEDINA *et al.* (20) showing the sensitivity of *Leishmania brasiliensis* to iodoacetamide, the metabolic studies of RYLEY (25, 26) with *Strigomonas oncopelti* and ten species of trypanosomes, and the work of CHATTERJEE and GHOSH (9) on the action of several substances on the respiration of *L. donovani.* FULTON and SPOONER (13) demonstrated the parallelism between cyanide sensitivity or insensitivity and the presence or absence of cytochrome pigments in several species of trypanosomes representing all the groups of Hoare. In the present paper data are presented about the effect of five different metabolic inhibitors upon the respiration of four species of hemoflagellates. Appreciation is expressed to Dr. Clark P. Read for advice and criticism during this work.

---

* This paper is based on a portion of a dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Sc. D. in the School of Hygiene and Public Health, Johns Hopkins University, during the tenure of a John Simon Guggenheim Fellowship. This work was carried out at the Department of Pathobiology, School of Hygiene and Public Health, and supported in part by a grant from the U. S Public Health Service (E-783).

** Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica.

MATERIAL AND METHODS

ORGANISMS. Details of the origin of the strains of *Endotrypanum schaudinni, Leishmania enriettii, Schzotrypanum cruzi* and S. *vespertilionis* and the culture medium used, have been given in a previous paper (28).

MANOMETRIC EXPERIMENTS. The organisms were harvested in the exponential phase of growth, washed by three repeated centrifugations in Krebs-Ringer phosphate (pH 7.2) and resuspended in an adequate volume of the same solution before use in manometric techniques. Oxygen consumption, determined by conventional Warburg respirometry, was followed for 2 hours under air at a temperature of 31° C. Details of the procedure have been described previously (28). Three concentrations of each metabolic inhibitor, in duplicate flasks, were used, with glucose added in a final concentration of 0.01 M. Control flasks with the substrate but without the inhibitor were also set up and endogenous respiration was likewise determined in duplicate. Two flasks without the substrate and with the highest concentration of the inhibitor accompanied each experiment. The glucose and the inhibitor were placed from the beginning in the main compartment, readings being started after a 10 minute period of equilibration. Iodoacetic acid was dissolved in 0.1 N NaOH to give a 0.1 M solution. Sodium azide, sodium fluoroacetate and sodium arsenite were also prepared in 0.1 M solutions, the latter being neutralized with HCl. These four substances were used in final concentrations of 10^{-3}, 10^{-4} and 10^{-5} M. A 0.1 M solution of potassium cyanide was prepared and neutralized with HCL, and the inhibitor used in final concentrations of 0.46 x 10^{-3}, 10^{-4} and 10^{-5} M, as recommended by ROBBIE (22, 23). In those flasks without cyanide, 0.2 ml of a 0.5 M solution of KOH was used in the center well while in the others, 0.2 ml of a mixture of KCN-KOH was used, calculated from the data presented by ROBBIE (23). At the end of the 2 hour period one drop from each flask was examined under the microscope to determine the extent of motility, using the flasks containing glucose alone as the reference point.

NITROGEN DETERMINATIONS. These were carried out either by the technique of KABAT and MAYER (16) or by the nesslerization procedure described by LANG (18). In both cases, the same standard solution of ammonium sulfate was used.

RESULTS

In tables 1, 2 and 3 the degrees of inhibition produced by the inhibitors on each of the species are presented. Some of the patterns of these inhibitions are illustrated in figures 1 to 8. All the organisms were sensitive to the different substances but important quantitative differences can be pointed out. *E. schudinni* showed the highest sensitivity to the thiol inhibitors, iodoacetate being more effective than arsenite, as is frequently the case with other cells. The species of *Schizotrypanum* were not very sensitive to arsenite, a concentration of 10^{-4} M of the substance inhibiting the respiration of *S. cruzi* and *S. vespertilionis* about 6 per cent, in contrast to a respiratory in-

TABLE 1

Effect of Sodium Iodoacetate and Sodium Arsenite on the respiration of the hemoflagellates

SPECIES		Na Iodoacetate 10^{-3} M	Na Iodoacetate 10^{-4} M	Na Iodoacetate 10^{-5} M	Na Arsenite 10^{-3} M	Na Arsenite 10^{-4} M	Na Arsenite 10^{-5} M
E. schaudinni	Respiration as % of control *	1.4	1.4	4.5	3.8	8.4	45.2
	Motility **	0	0	±	0	0	+
L. enriettii	Respiration as % of control	2.8	7.3	79.6	17.8	54.5	97.3
	Motility	0	±	++++	0	±	++++
S. vespertilionis	Respiration as % of control	13.6	24.3	74.8	33.1	93.8	93.8
	Motility	0	+	++++	+	++++	++++
S. cruzi	Respiration as % of control	11.5	20.9	68.9	38.6	93.6	93.1
	Motility	±	+	++++	±	++++	++++

* Control — with glucose and without inhibitor.

** O = absence of movement; ± = only few organisms with movement + to +++ = intermediate degrees of motility; ++++ = normal motility of control.

TABLE 2

Effect of Potassium Cyanide and Sodium Azide on the respiration of the hemoflagellates

SPECIES		K Cyanide			Na Azide		
		0.46×10^{-3} M	10^{-5} M	10^{-4} M	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M
E. schaudinni	Respiration as % of control	3.3*	12.6	43.8	19.6	75.7	108.2
	Motility	0	+	++	0	++	++++
L. enriettii	Respiration as % of control	9.0	20.1	45.4	37.5	62.5	97.0
	Motility	++++	++++	++++	0	++	+++
S. vespertilionis	Respiration as % of control	16.1	31.3	56.3	23.4	61.3	96.1
	Motility	++++	++++	++++	++	+++	++++
S. cruzi	Respiration as % of control	14.2	29.1	52.5	26.3	65.0	95.1
	Motility	++++	++++	++++	+	++	++++

* Figures and symbols as in Table 1.

hibition of almost 92 per cent for *E. schaudinni* at the same concentration of arsenite. *L. enriettii* in general exhibited an intermediate sensitivity to the thiol inhibitors and all the data seem consistent with the relative importance of carbohydrate metabolism in each of the four species (29). In the case of the thiol inhibitors, the degrees of inhibition corresponded fairly well to decreases in motility. Cyanide inhibited the respiration of the four species to approximately the same extent. In the presence of cyanide, only *Endotrypanum* exhibited a considerable depression of motility, which in the other three species was apparently normal, even with the highest concentration of inhibitor. Azide was a less effective inhibitor of respiration and the lowest concentration (10^{-5} M) was without effect on the respiration of any of the flagellates. The latter substance depressed the motility of all the species.

Fluoroacetate which is presumed to result in production of fluorocitrate which, in turn, has and inhibitory effect upon aconitase, produced similar degrees of respiratory inhibition with all the four species. *E. schaudinni* was slightly more sensitive to this compound than were the other species. This is correlated with the intensity of oxidation of the Kreb's cycle intermediates by the organisms (30). As in the case of cyanide, only in *E. schaudinni* was motility affected by fluoroacetate. In several instances the highest dilution of the inhibitor with some action upon the respiration began showing some inhi-
the inhibitor with some action upon the respiration began showing some inhibitory effect 45 or more minutes after the experiment was commenced. This might be due to a low rate of penetration and slow accumulation of an inhibitory amount inside the cell.

In Table 4 a comparison has been made of the effect of the highest concentration of each inhibitor upon the endogenous respiration of the parasites. Endogenous respiration was depressed in all cases to differing degrees, except that azide was without effect on *L. enriettii.* The endogenous respiration of the two species of *Schizotrypanum* was only slightly sensitive to the same inhibitor. It can be appreciated from Table 4 that, in the case of *Endotrypanum* and *Leishmania,* the remaining motility in the endogenous control is very low. The two species of *Schizotrypanum* showed high motility in the controls, after the same period.

DISCUSSION

Some evidence has been accumulated with trypanosomids showing that iodoacetate is a powerful inhibitor of triosephosphate dehydrogenase and that arsenite has a more specific action upon hexokinase (19, 27). *E. schaudinni* is the most sensitive to the thiol inhibitors and the two *Schizotrypanum,* very similar in all their reactions, were the least sensitive. *S. cruzi* and *S. vespertilionis* are only slightly sensitive to arsenite, indicating that either their -SH enzymes (e. g. hexokinase) have different properties or that an alternative pathway can be utilized in those cases once a block has been obtained. It is a well known fact that the same enzymes from different organisms may vary in reaction to a particular inhibitor (15). *L. enriettii* behaves in its response to the inhibitors,

TABLE 3

Effect of Sodium Fluoroacetate on the respiration of the hemoflagellates

SPECIES		Na Fluoroacetate 10-3M	10-4 M	10-5M
E. schaudinni	Respiration as % of control	41.2*	56.0	76.0
	Motility	+	++	+++
L. enriettii	Respiration as % of control	66.8	78.3	88.5
	Motility	+++	++++	++++
S. vespertilionis	Respiration as % of control	44.4	70.7	85.8
	Motility	++++	++++	++++
S. cruzi	Respiration as % of control	43.7	76.9	91.8
	Motility	++++	++++	++++

* Figures and symbols as in Table 1.

as already stated, as an intermediate of the other cases. CHATTERJEE *et al.* (10) have studied in detail the hexokinase of the kala-azar organism *L. donovani.* The enzyme was practically insensitive to thiol inhibitors such as p-chloromercuric benzoate and iodoacetate (10^{-4} M) giving the impression that the hexokinase of this hemoflagellate "is not markedly dependent upon functional -SH groups for its activity".

Since all organisms were sensitive to cyanide and azide, it is likely that heavy metal-containing enzymes play a role in their terminal respiration. Cytochrome b, at least, has been reported in *S. cruzi* by several authors (2, 13, 26). Sodium azide is regarded as a less potent inhibitor than cyanide at physiological pH, being more effective on the acid side (17), which may explain its lower action in the case of the hemoflagellates. *E. schaudinni* was the only species whose motility was affected by cyanide and azide. This indicates that some steps of energy metabolism are heavy-metal-dependent. These are not necessarily only terminal steps, since an aldolase activated by metals and inhibited by chelating agents has been reported in the flagellate protozoan *Trichomonas vaginalis* (1). RYLEY (24) has suggested that a metal ion is involved at some stage in the glucose fermentation process of *Trypanosoma lewisi.* Nevertheless, motility is also depressed in *E. schaudinni* by fluoroacetate, a substance that is not thought to affect energy metabolism at a level above that of pyruvate oxidation (12, 21). This seems to be another indication of the importance of the Kreb's cycle in the chemical economy of this organism. The effect of azide on the motility of the other three species may be related to the fact that this substance has been reported to inhibit phosphorylation and formation of energy-rich compounds during glycolysis (15). Cyanide may considerably decrease oxygen uptake by blocking the final oxidase system, with glycolysis continuing and producing the necessary energy for the normal movement of the parasites.

Fluoroacetate inhibitions are regarded as confirmation of the relative importance of the Kreb's cycle in the organisms (30). The species *T. pipistrelli,* reported by VON BRAND *et al.* (8) to be entirely insensitive to fluoroacetate, differs in this important aspect from our *S. vespertilionis.* According to the literature, these two trypanosomes from bats are neither biologically nor morphologically different and, for that reason, the two names are considered synonyms (11). The author favors the view that the *T. pipistrelli* culture of VON BRAND *et al.* (8) is not *S. vespertilionis* but is a different trypanosome from bats.

The present results on the degree of inhibition of *S. cruzi* by the different substances employed coincide with those reports in the literature as far as arsenite, cyanide, and fluoroacetate are concerned (5, 8, 26). Furthermore, VON BRAND and JOHNSON (5) have reported good motility in the flagellates, at the end of the experiment, in the presence of a concentration of 10^{-3} M cyanide. With the same species, *S. cruzi,* we obtained higher inhibition with iodoacetate and azide than reported by VON BRAND *et al.* (6), VON BRAND *et al.* (8), and RYLEY (26). *L. enriettii* seems to be more sensitive to cyanide than the three human species of the same genus (5).

TABLE 4

Effect of the highest concentration of inhibitor on the endogenous respiration of the hemoflagellates

SPECIES		Iodoacetate $10^{-3}M$		Arsenite $10^{-3}M$		Cyanide $0.46x10^{-3}M$		Azide $10^{-3}M$		Fluoroacetate $10^{-3}M$	
		E	E+I	E	E+I	E	E+I	E	E+I	E	E+I
E. schaudinni	% of respiration	100.0	47.0*	100.0	10.0	100.0	27.3	100.0	28.3	100.0	0.0
	Motility**	±	0	0	0	±	0	+	0	0	0
L. enriettii	% of respiration	100.0	0.0	100.0	50.0	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0	8.6
	Motility	+	0	+	0	+	0	±	±	+	+
S. vespertilionis	% of respiration	100.0	39.7	100.0	54.2	100.0	6.4	100.0	83.5	100.0	51.4
	Motility	++	0	++++	±	+++	+	++++	++	++++	++
S. cruzi	% of respiration	100.0	30.3	100.0	50.9	100.0	0.0	100.0	82.5	100.0	42.2
	Motility	++	0	+++	0	++	+	+++	++	+++	++

E = Endogenous; E + I = Endogenous + Inhibitor

* Respiration of Endogenous plus inhibitor expressed as relative percentage of Endogenous.

** Motility as compared with the control with glucose and without inhibitor.

The effect of the inhibitors upon the endogenous respiration of the flagellates may be interpreted in several ways. The low endogenous respiration of *E. schaudinni,* inhibited by all the substances tested, was more affected by arsenite than by iodoacetate, perhaps because the former compound interferes with the oxidative decarboxylation of pyruvate. Fluoroacetate was the only one that reduced the remaining respiration of this species to zero, further suggesting that the short survival of flagellate in the absence of glucose is due to the oxidation of small amounts of the products of carbohydrate metabolism. Endogenous respiration of *L. enriettii* was more sensitive to iodoacetate, cyanide and also to fluoroacetate but, curiously enough, not at all to azide. This could be either a failure of the compound to penetrate the cells in the absence of glucose, or complete insensitivity of the oxidative processes in the cell. Endogenous respiration of the two *Schizotrypanum* is not greatly depressed by the inhibitors except for cyanide. Amino acid oxidation may account for a major part of endogenous respiration in *Schizotrypanum.* The findings by RYLEY (26) that the culture-form of *S. cruzi* produces ammonia when respiring in the absence of any substrate lends further support to this idea. On the other hand, the oxidation of lipids, poorly investigated as energy sources in this organism, may account for another part of the respiration. In connection with this, VON BRAND *et al.* (7) have pointed out that "the culture-form of *T. cruzi* contains considerably more lipids than carbohydrates."

SUMMARY

Two thiol inhibitors, two inhibitors of heavy metal catalysis and an inhibitor of the Kreb's cycle, were tested against the respiration of *Endotrypanum schaudinni, Leishmania enriettii, Schizotrypanum cruzi* and *S. vespertilionis,* both in the presence and absence of glucose.

All the species were more or less sensitive to iodoacetate, *E. schaudinni* being the most sensitive one. This species and *L. enriettii* were inhibited to a great extent by arsenite, whereas the respiration of the two *Schizotrypanum* was considerably more resistant to this substance. This is explained in terms of the more important role that -SH enzymes play in the case of the first two species. Furthermore, a good correlation between motility and degree of inhibition by the thiol inhibitors was observed.

The flagellates were more sensitive to cyanide than to azide. No arrest in motility was observed with *L. enriettii, S. vespertilionis* and *S. cruzi* in the case of cyanide. Some suggestions are made to explain the response of the flagellates to these two inhibitors. It seems likely that cytochrome pigments of some kind are important in the final respiration of the organisms.

The inhibition produced by fluoroacetate is regarded as further indication of the presence of a complete tricarboxylic acid cycle in the flagellates.

The effect of the inhibitors upon the endogenous respiration of the parasites provided some clues as to the nature of this process, which showed some differences among the three genera studied.

RESUMEN

Se prueba el efecto de cinco inhibidores metabólicos (arsenito, iodoacetato, cianuro, azida de sodio y fluoroacetato) sobre la respiración de *Endotrypanum schaudinni, Leishmania enriettii, Schizotrypanum cruzi* y *S. vespertilionis*, en presencia y ausencia de glucosa.

E. schaudinni fue el más sensible a iodoacetato y esta especie y *L. enriettii* fueron bastante sensibles a arsenito mientras que los dos *Schizotrypanum* se mostraron más resistentes a esta sustancia. Tal comportamiento parece encontrar explicación en la mayor importancia que tienen las enzimas con grupos -SH en el caso de las dos primeras especies. Además se encontró una buena correlación entre la disminución de motilidad y el grado de inhibición producida por los dos inhibidores de grupos tiólicos en todas las especies.

Los flagelados se mostraron más sensibles al cianuro que a la azida de sodio. No se observó efecto en la motilidad por parte del cianuro en el caso de *L. enriettii, S. vespertilionis* y *S. cruzi*. Se hacen algunos comentarios tratando de explicar las respuestas de los flagelados a estos dos inhibidores. Parece posible que pigmentos de tipo citocromo son importantes en la respiración final de los mismos.

La inhibición producida por el fluoroacetato se considera como una prueba más de la existencia de un ciclo de Krebs completo en los flagelados.

El efecto de las sustancias sobre la respiración endógena muestra ciertas diferencias entre los géneros estudiados, y da alguna indicación sobre el tipo de proceso metabólico en los mismos.

REFERENCES

1. BAERNSTEIN, H. D.
1955. Aldolase in *Trichomonas vaginalis*. *Exptl. Parasitol.*, 4: 323-334.

2. BAERNSTEIN, H. D. and E. J. TOBIE
1951. Cytochrome system of *Trypanosoma cruzi*. *Feder. Proc.*, 10: 159.

3. BRAND, T. VON
1951. Metabolism of Trypanosomidae and Bodonidae. In Lwoff, A., *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Academic Press Inc. N. York, 177-234.

4. BRAND, T. VON
1951. The physiology of blood flagellates. In Most. H., *Parasitic Infections of Man*, Columbia Univ. Press, 90-113.

5. BRAND, T. VON and E. M. JOHNSON
1947. A comparative study of the effect of cyanide on the respiration of some Trypanosomidae. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 29: 33-49.

6. BRAND, T. VON, E. M. JOHNSON and C. W. REES
1946. Observations on the respiration of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J. Gen. Physiol.*, 30: 163-175.

7. BRAND, T. VON, P. MCMAHON, E. J. TOBIE, M. J. THOMPSON and E. MOSETTING
1959. Chemical composition of the culture form of *Trypanosoma cruzi*. *Exptl. Parasitol.*, 8: 171-181.

8. BRAND, T. VON, E. J. TOBIE and B. MEHLMAN
1950. The influence of some sulfhydryl inhibitors and of fluoroacetate on the oxygen consumption of some trypanosomes. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 35: 273-300.

9. CHATTERJEE, A. N. and J. J. GHOSH
1959. Studies on the metabolism of *Leishmania donovani*, the causative organism for kala-azar. *Ann. Bioch. Exp. Med. Calcutta*, 19: 37-50.

10. CHATTERJEE, A. N., J. C. RAY and J. J. GHOSH
1958. Hexokinase activity in cell free extracts of *Leishmania donovani*. *Nature*, 182: 109-110.

11. DIAS, E.
1935. Revisão geral dos hemoflagellados de Chiropteros. *9º Reunión Soc. Argentina Patol. Reg.*, 11-88.

12. ELLIOTT, W. B. and O. KALNITSKY
1950. Mechanism of fluoroacetate inhibition. *Feder. Proc.*, 9: 168-169.

13. FULTON, J. D. and D. F. SPOONER
1959. Terminal respiration in certain mammalian trypanosomes. *Exptl. Parasitol.*, 8: 137-162.

14. HOARE, C. A.
1957. The classification of Trypanosomes of veterinary and medical importance. *Veter. Rev. Ann.*, 3: 1-13.

15. JAMES, W. O.
1953. The use of respiratory inhibitors. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4: 59-90.

16. KABAT, E. A. and M. M. MAYER
1948. *Experimental Immunochemistry*, Charles C. Thomas, Illinois, 567 pp.

17. KEILIN, D.
1936. The action of sodium azide on cellular respiration and on some catalytic oxidation reaction. *Proc. R. Soc. London, B*, 121: 165-173.

18. LANG, C. A
1958. Simple microdetermination of Kjeldahl nitrogen in biological materials. *Anal. Chem.*, 30: 1692-1694.

19. MARSHALL, P. B.
1948. The glucose metabolism of *Trypanosoma evansi* and the action of trypanocides. *Brit. J. Pharmacol.*, 3: 8-14.

20. MEDINA, H., D. AMARAL and M. BACILA
1955. Estudos sôbre o metabolismo de protozoarios do gênero *Leishmania*. I. Vias de oxidação da glicose e do acetato pela *Leishmania brasiliensis* Vianna, 1911. *Arq. Biol. Tecnol.*, 10: 97-102.

21. POTTER, R. VAN and H. BUSCH
1950. Effect of fluoroacetate on reactions in the Krebs oxidative cycle. *Feder. Proc.*, 9: 215.

22. ROBBIE, W. A.
1946. The quantitative control of cyanide in manometric experimentation. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 27: 181-209.

23. ROBBIE, W. A.
1948. Use of cyanide in tissue respiration studies. In V. R. Potter, *Methods in Medical Research*, The Year Book Publ. Inc. Chicago, 307-316.

24. RYLEY, J. F.
1953. Carbohydrate metabolism in Protozoa and metal-binding substances. *Nature*, 171: 747-748.

25. RYLEY, J. F.
1955. Studies on the metabolism of the Protozoa. 4. Metabolism of the parasitic flagellate *Strigomonas oncopelti*. *Biochem. J.*, 59: 353-361.

26. RYLEY, J. F.
1956. Studies on the metabolism of the Protozoa. 7. Comparative carbohydrate metabolism of eleven species of trypanosome. *Biochem. J.*, 62: 215-222.

27. THURSTON, J. P.
1958. The effect of some metabolic inhibitors on the oxygen uptake of *Trypanosoma lewisi* and *T. equiperdum*. *Parasitology*, 48: 165-183.

28. ZELEDÓN, R.
1960. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. I. Endogenous respiration and respiration in the presence of glucose. *J. Protozool.*, 7 (2): 146-150.

29. ZELEDÓN, R.
1960. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *J. Parasit.*, 46 (5): 541-551.

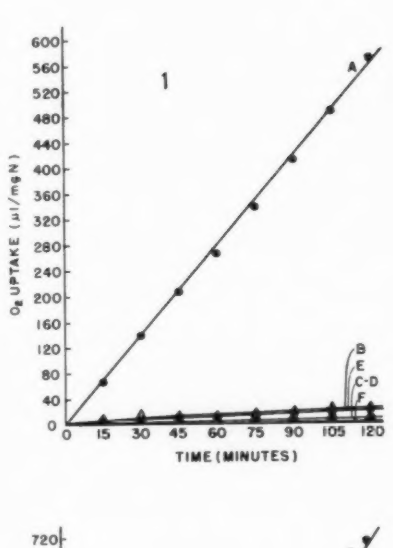
30. ZELEDÓN, R.
1960. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. III. Effect of the Kreb's cycle intermediates on the respiration. *Rev. Biol. Trop.*, 8 (1): 25-33.

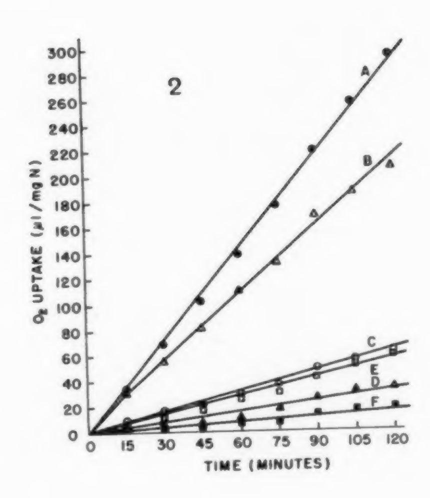
Fig. 1: Effect of Sodium Iodoacetate on the respiration of *E. schaudinni* A = glucose, B = glucose + 10^{-5} M. Io., C = glucose + 10^{-4} M. Io., D = glucose + 10^{-3} M. Io., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3} M. Io.

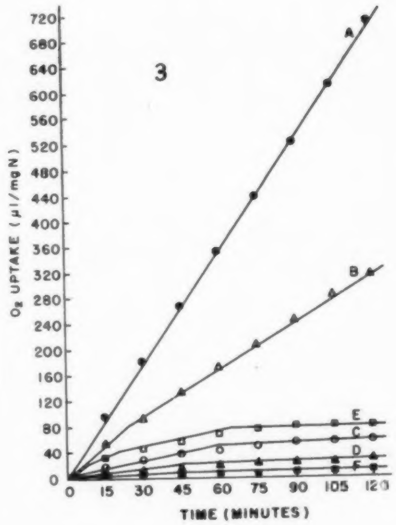
Fig. 2: Effect of Sodium Iodoacetate on the respiration of *S. cruzi*. A = glucose, B = glucose + 10^{-5} M. Io., C = glucose + 10^{-4} M. Io., D = glucose + 10^{-3} M. Io., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3} M. Io.

Fig. 3: Effect of Sodium Arsenite on the respiration of *E. schaudinni*. A = glucose, B = glucose + 10^{-5}M. ars., C = glucose + 10^{-4}M. ars., D = glucose + 10^{-3}M. ars., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3}M. ars.

Fig. 4: Effect of Sodium Arsenite on the respiration of *S. cruzi*. A = glucose, B = glucose + 10^{-5}M. ars., C = glucose + 10^{-4}M. ars., D = glucose + 10^{-3}M. ars., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3}M. ars.


1
A
B
E
C-D
F
O_2 UPTAKE (µl/mgN)
TIME (MINUTES)


2
A
B
C
E
D
F
O_2 UPTAKE (µl/mgN)
TIME (MINUTES)


3
A
B
E
C
D
F
O_2 UPTAKE (µl/mgN)
TIME (MINUTES)

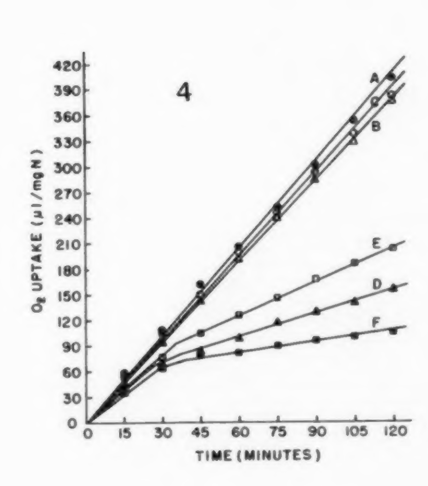
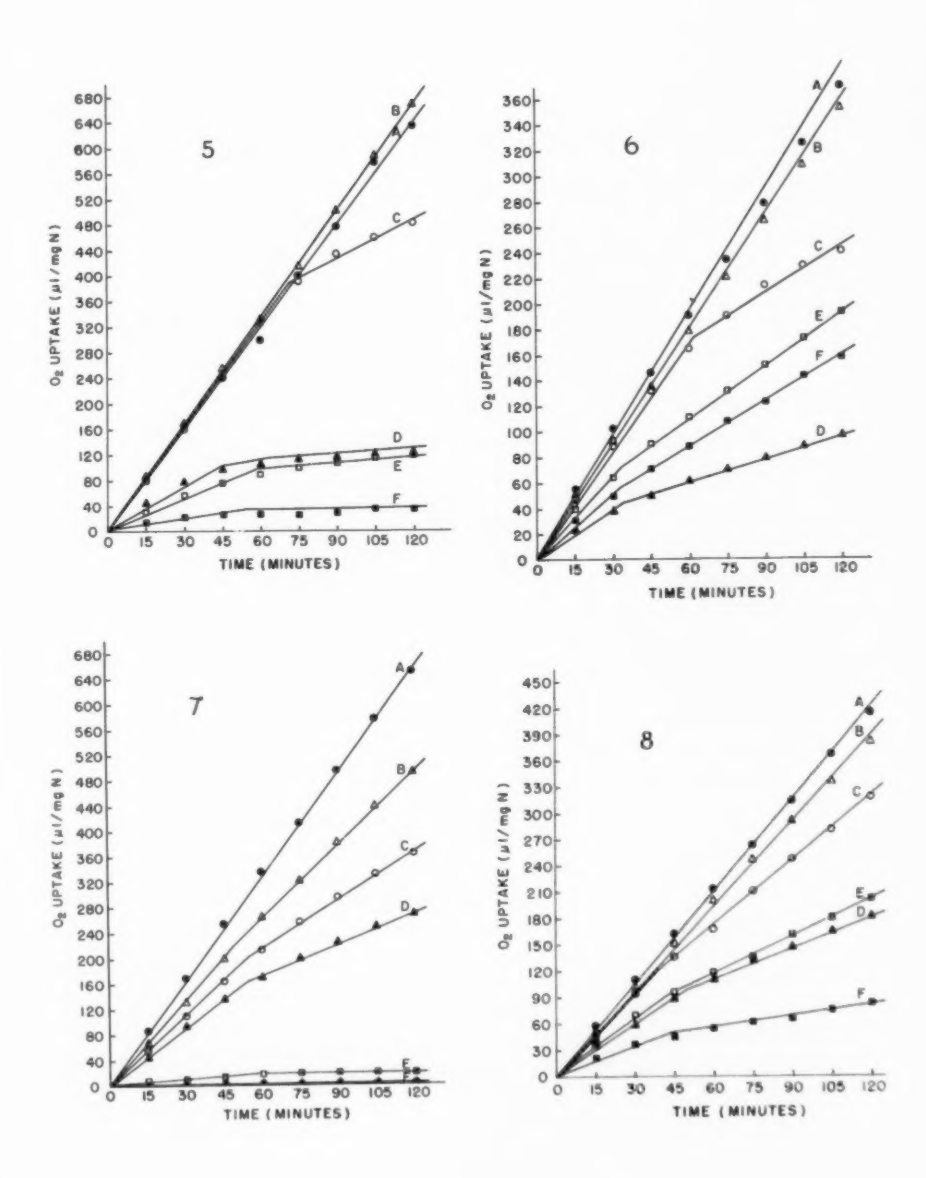

4
A
C
B
E
D
F
O_2 UPTAKE (µl/mgN)
TIME (MINUTES)

Fig. 5: Effect of Sodium Azide on the respiration of *E. schaudinni*. A = glucose, B = glucose + 10^{-5}M. azi., C = glucose + 10^{-4} M. azi., D = glucose + 10^{-3} M. azi., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3} M. azi.

Fig. 6: Effect of Sodium Azide on the respiration of *S. cruzi* A=glucose, B=glucose+10^{-5}M. azi., C=glucose+10^{-4} M. azi., D = glucose + 10^{-3} M. azi., E = endogenous F = endogenous + 10^{-3} M. azi.

Fig. 7: Effect of Sodium Fluoroacetate on the respiration of *E. schaudinni* A = glucose, B = glucose + 10^{-5}M. fluo., C = glucose + 10^{-4}M. fluo., D = glucose + 10^{-3}M. fluo., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3} M. fluo.

F. 8: Effect of Sodium Fluoroacetate on the respiration of *S. cruzi*. A = glucose, B = glucose + 10^{-5} M. fluo., C = glucose + 10^{-4} M. fluo., D = glucose + 10^{-3}M. fluo., E = endogenous, F = endogenous + 10^{-3} M. fluo.



Rev. Biol. Trop., 8(2): 197-199, 1960

Presencia de formas larvarias de Oncicola oncicola (Acanthocephala) en una gallina doméstica

por

Rodrigo Zeledón* y Guido Arroyo**

(Recibido para su publicación el 22 de agosto de 1960)

Durante la necropsia de una gallina doméstica adulta (*Gallus gallus domesticus*), enviada para su observación al Laboratorio de Investigaciones Médico-Veterinarias del Ministerio de Agricultura e Industrias, tuvimos oportunidad de sorprender en el tejido subcutáneo y muscular de la región pectoral, cerca de 20 quistes blanquecinos, de unos 2 a 3 mm de tamaño, con pared gruesa y resistente, que al abrirse dejaban escapar una acantela. La gallina provenía de Parrita en la costa del Pacífico, Cantón de Aguirre, Provincia de Puntarenas, y las larvas, una vez fijadas y coloreadas con carmín clorhídrico, fueron identificadas como acantelas de *Oncicola oncicola* (v. Ihering, 1892) Travassos, 1916. (figs. 1 y 2). El acantocéfalo adulto es un parásito común en Brasil en el estómago de varias especies de félidos (*Felis spp.*) y las formas larvales han sido señaladas en tejido conjuntivo de armadillos por TRAVASSOS (*Mem. Inst. Osw. Cruz,* 9: 5-62, 1917), cuya identificación específica correcta es puesta en duda por WITENBERG (*Livr. Jub. Prof. Travassos,* p. 537-560, 1938). Las larvas encontradas por nosotros miden, una vez comprimidas, de 3,5 a 3,9 mm con la probóscide invaginada y cerca de 4,1 a 4,6 mm cuando la misma se encuentra fuera del cuerpo. Las dimensiones y formas de los ganchos corresponden bien a la especie en cuestión y una descripción detallada ha sido presentada por PEREIRA (*Arch. Inst. Biol. São Paulo,* 7: 245-251, 1936). Este último autor, encontró las mismas larvas enquistadas en tejido subcutáneo y muscular de una paloma silvestre en Brasil (*Leptoptila verreauxi ochroptera*). El mismo PEREIRA, teje una serie de comentarios interesantes en relación a su hallazgo, haciendo resaltar la importancia biológica de un "huésped portador" que después de haberse alimentado de artrópodos infectados, huéspedes intermediarios normales del acantocéfalo,

* Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica
** Laboratorio de Investigaciones Médico-Veterinarias del MAI. Costa Rica.

vendrían a servir de repasto a los carnívoros para completarse así el ciclo. Nuestro hallazgo en una gallina doméstica viene a fortalecer esta hipótesis, y no tenemos noticias de que las gallinas hallan sido inculpadas con anterioridad de albergar larvas de *Oncicola*. Hallazgos semejantes pueden considerarse el de PRICE (*J. Parasit.* 15: 290, 1929), quien tuvo oportunidad de examinar larvas de un acantocéfalo encontradas debajo de la capa epitetial del esófago de pavos jóvenes de San Angelo, Texas, y que él consideró como siendo de *O. canis*; y el de TRAVASSOS (*Mem. Inst. Osw. Cruz,* 19: 31-125, 1926) quien encontró acantelas de *Macracanthorhynchus hirudinaceus* enquistadas subcutáneamente en una gallina doméstica en Brasil, sin que en este último caso pueda decirse que el hallazgo tenga importancia en el ciclo biológico del parásito.

Fig. 1: Forma larvaria de *Oncicola oncicola* encontrada en la gallina.

Fig. 2: Larva con la probóscide expuesta. Negativos con 12,5 x, aumentados aproximadamente 3,5 veces. Fotos Dr. J. L. Solano A.


1
2

Rev. Biol. Trop., 8(2):201-202, 1960

Hallazgo de Schizotrypanum cruzi **en un puerco espín** (Coendou mexicanum laenatum) **de Costa Rica**

por

Rodrigo Zeledón* Carlos L. Pérez**

y

Angeles Berríos**

(Recibido para su publicación el 26 de agosto de 1960)

Recientemente, uno de nosotros (C. P.) tuvo oportunidad de dar muerte a un ejemplar adulto de puerco espín en las cercanías de San Ramón, Cantón de la Unión, Provincia de Cartago. Con la sangre del animal se hicieron cultivos en 5 tubos con medio difásico de Rugai; uno de los tubos mostró, algunos días después, flagelados con características morfológicas semejantes a las de *Schizotrypanum cruzi*. A partir de este cultivo se inocularon 5 ratones blancos de unos 20 gramos cada uno, 2 tubos con medio líquido especial para *S. cruzi* (cf. ZELEDÓN, R., *J. Parasit.* 45: 652, 1959) y se hizo xenodiagnóstico artificial con 10 larvas de *Rhodnius prolixus*. Dos semanas después los ratones mostraron numerosos tripanosomas en la sangre idénticos a *S. cruzi*; los tubos con medio líquido dieron lugar a un crecimiento razonable, que puede mantenerse a través de pases seriados en el mismo medio con tendencias a aumentar; de los insectos, examinados tres semanas después de la comida, 7 se mostraron infectados. Los cortes histológicos de corazón de los ratones revelaron los típicos nidos de leishmanioides del parásito.

Esta subespecie de puerco espín parece ser la única existente en el territorio costarricense y se extiende hasta el Oeste de Panamá (cf. GOODWING, G.

---

* Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica.
** Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

G., Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 87:271-474, 1946). Hasta hoy, el único reservorio silvestre de enfermedad de Chagas que se conocía de nuestro territorio era el "zorro pelón" (*Didelphis marsupialis*) (cf. ZELEDÓN, R., *Rev. Goiana Med.* 5: 439-444, 1959). Una especie afin, el *Coendou prehensilis* de América del Sur, ha sido hallada infectada por *S. cruzi* en Venezuela (cf. PIFANO, F. *et al.*, *1ª Reunión Panamer. Enf. de Chagas* 1: 91-95, 1950).

Rev. Biol. Trop., 8(2): 203-217, 1960

Investigaciones sobre enfermedad de Chagas en Costa Rica por la reacción de fijación del complemento *

por

Angeles Berríos * *

(Recibido para su publicación el 6 de setiembre de 1960)

En 1952 ZELEDÓN (28) practicó las primeras reacciones de fijación del complemento para el diagnóstico de enfermedad de Chagas entre nosotros. El trabajo lo realizó en niños escolares de 3 zonas con triatomas (*T. dimidiata*) y de una en donde el vector es desconocido. De 317 reacciones de las zonas endémicas obtiene 5,6 por ciento de positividad y de 90 de la otra zona únicamente 1,1 por ciento. Tomando en cuenta éstos antecedentes podemos suponer la existencia en Costa Rica de cierto porcentaje de enfermos chagásicos que no son descubiertos clínicamente y evolucionan hacia un estado crónico o "indeterminado" como sucede en otros países del Continente.

El valor diagnóstico de la reacción de fijación del complemento para descubrir los casos crónicos de la enfermedad de Chagas ha sido tema de numerosas publicaciones desde el trabajo de GUERREIRO y MACHADO en 1913 (9), quienes aplicaron por primera vez la reacción de Bordet-Gengou en el diagnóstico de esta tripanosomiasis.

Durante muchos años se tuvo como gran inconveniente la obtención y preparación del antígeno hasta que KELSER (12) introdujo un antígeno preparado a partir de formas de cultivos de *Schizotrypanum cruzi* que posteriormente fue mejorado por DAVIS (5) quien preparó antígenos preservados con mertiolato, suficientemente estables, específicos y no anticomplementarios. FREITAS y ALMEIDA (7) en 1949 describen un nuevo tipo de antígeno extraído con benceno, en el cual se reduce al mínimo la capacidad anticomplementaria,

---

* Este trabajo fué realizado en los laboratorios del Hospital San Juan de Dios y de la Universidad de Costa Rica y representa un extracto de la Tesis de Grado del mismo nombre presentada a la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

** Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

estando por otro lado dotado de una estabilidad mayor y de gran capacidad fijadora específica.

Un buen número de investigadores ha seguido la técnica de Kolmer con diferentes modificaciones, habiendo por lo tanto con este método cierta variación de criterio en cuanto al grado de intensidad de las reacciones consideradas como positivas. FREITAS (6) en 1951 aplicó la técnica cuantitativa de Wadsworth *et al.*, que utiliza el principio del 50 por ciento de hemólisis para la dosificación del complemento y empleó el antígeno descrito en colaboración con ALMEIDA (l. c.). FREITAS explica la importancia de usar esta técnica, ya que permite tener un mayor control sobre los reactivos y posee mayor sensibilidad.

Actualmente la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas ha tomado mayor importancia, ya que diversos investigadores la aplican en individuos no seleccionados, para diagnosticar los casos en la fase crónica. Además, ha adquirido gran valor en la selección de donadores de sangre, desde que FREITAS *et al.* (8) y NUSSENZWEIG *et al.* (19) reportaron los primeros casos de transmisión de la enfermedad por transfusión sanguínea.

Con el fin de conocer hasta qué punto tendría valor entre nosotros el practicar rutinariamente la reacción de GUERREIRO y MACHADO en pacientes del Hospital San Juan de Dios y principalmente en donadores de sangre que, aparentemente sanos, pueden ser portadores y transmisores de la tripanosomiasis, realizamos este trabajo con sueros de individuos sin seleccionar, que llegan al Laboratorio Bacteriológico del mencionado Hospital. Con los datos aquí presentados esperamos poner en evidencia la importancia que tiene la enfermedad de Chagas en el país y el problema que representan los donadores de sangre con reacción de fijación del complemento positiva.

MATERIAL Y METODOS

REACCIÓN CUALITATIVA

Para ésta reacción se siguió en términos generales la técnica de KOLMER (13), usándose un volumen final de 1,5 ml por tubo, incluyendo siempre tubos controles de suero y sueros conocidos positivos y negativos.

SISTEMA HEMOLITICO. El sistema hemolítico se preparó mezclando 0,25 ml de una dilución 1/600 de hemolisina conteniendo dos unidades hemolíticas, con una cantidad igual de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 2 por ciento.

COMPLEMENTO. Se usó complemento liofilizado Sclavo (Instituto Sieroterápico e Vaccinogeno Toscano, Italia). Después de restablecido el volumen se diluyó con solución salina helada y se mantuvo siempre en baño de hielo. Se usaron en la reacción 0,2 ml de una dilución 1/10, cantidad que corresponde en nuestro caso a dos unidades 100 por ciento de hemólisis.

ANTÍGENO. El antígeno se preparó con la cepa D-1 de *S. cruzi* del Hospital San Juan de Dios, cedida por el Dr. Alfonso Trejos. Los flagelados se

cultivaron en el medio N. N. N. con ligera modificación (28) obteniéndose un buen rendimiento en la obtención del antígeno. Los flagelados fueron cosechados y tratados según la técnica de Johnson descrita por ZELEDÓN (28). El antígeno se conservó congelado y resultó estar dotado de un buen poder fijador específico y desprovisto de poder anticomplementario, hemolítico y fijador inespecífico. La dosis óptima de antígeno correspondió a 0,2 ml de una dilución 1/40.

SUEROS. El trabajo se realizó con sueros de pacientes del Hospital San Juan de Dios, que son enviados al Laboratorio Bacteriológico para serles practicada la reacción de V. D. R. L. Una vez recogidos los sueros se tomaron datos de los pacientes así: edad, padecimiento, residencia y resultado de la reacción de V. D. R. L.

En total se estudiaron 1000 sueros, la mayoría de personas adultas, entre los que se incluyeron 221 de donadores de sangre, del mismo Hospital y 73 de enfermos mentales del Asilo Chapuí. El trabajo se hizo en sueros relativamente frescos, guardados en congelador por un tiempo máximo de tres días. Además, se incluyeron sueros de 5 casos de enfermedad de Chagas comprobada varios años antes por demostración del parásito, 4 sueros de casos de leishmaniasis tegumentaria, uno de un caso activo y los otros de casos antiguos curados, y 10 sueros de personas aparentemente normales.

REACCIÓN CUANTITATIVA

Se usó la solución buffer de barbituratos de KABAT y MAYER (11) para diluir todos los reactivos empleados en ésta técnica. Para titular los sueros se siguió la técnica descrita por FREITAS (6), el volumen final se modificó a 1,5 ml y se emplearon cubetas de 12 mm del Espectofotómetro Coleman Junior. Además, los glóbulos se estandarizaron para hacer lecturas colorimétricas con ese volumen, así como también los otros reactivos.

En la determinación de los títulos se siguió el método de dilución del suero usando siempre 3 unidades de complemento. Se incluyeron controles de todos los reactivos y de sueros positivos y negativos.

SISTEMA HEMOLÍTICO. El sistema hemolítico fue preparado mezclando partes iguales de una suspensión de glóbulos de carnero estandarizada a 10^9 células por ml según la técnica descrita por KABAT y MAYER (11), y una dilución 1/250 de hemolisina conteniendo dos unidades hemolíticas en 0,1 ml. Las lecturas se hicieron en el Espectrofotómetro Coleman Junior usando cubetas de 19 y 12 mm y longitud de onda de 540 mμ, correspondiendo las densidades ópticas a 0,75 y 0,47 respectivamente. Se leyeron diferentes concentraciones de hemoglobina comprendiendo diversos grados de hemólisis.

COMPLEMENTO. El complemento se tituló al 50 por ciento de hemólisis, según la técnica descrita por KABAT y MAYER (11), usando el mismo complemento liofilizado Sclavo. Se prefirió preincubar el complemento por una hora y media, en vez de una hora; luego se adicionó el sistema hemolítico incubándose de nuevo una hora, siendo estos los tiempos de incubación usados en la

reacción final, no introduciéndose, por lo tanto, ninguna corrección a la unidad 50 por ciento. El número de unidades encontradas fué de 125 por mililitro; para la reacción una unidad 50 por ciento correspondió a 0,04 ml de una dilución 1/25.

ANTÍGENO. Se usó el antígeno de FREITAS y ALMEIDA (7) empleando temperaturas de -10°C para la extracción. Los cultivos fueron hechos en medio "Leventhal-Eugon-Broth" empleado para *Hemophilus influenzae* y adaptado por Warren para el *S. cruzi*, según ZELEDÓN (30). Empleamos para la preparación del medio, sangre de vacunos al 15 por ciento en vez de sangre de carnero y filtramos en un filtro Buchner con una capa de algodón y otra de asbestos con la ayuda de una bomba de vacío.

El antígeno se encontró desprovisto de poder anticomplementario y hemolítico, siendo muy específico y de un alto poder fijador. Se conservó congelado a -10°C y la dosis óptima a usar fué de 0,1 ml de una dilución 1/20.

SUEROS. Se usaron los sueros que dieron fijación de 2, 3 y 4 cruces en la reacción cualitativa los cuales fueron guardados congelados por un lapso de 4 a 5 meses. Se incluyeron también los sueros positivos de los 5 casos de enfermedad de Chagas, los de leishmaniasis y los normales mencionados en la técnica cualitativa.

RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA REACCIÓN CUALITATIVA. Se consideraron positivos los sueros que dieron fijación de 3 y 4 cruces y como dudosos los que mostraron inhibición de hemólisis correspondiente a 2 cruces. En el Cuadro 1 se analizan los casos positivos y dudosos de acuerdo con su procedencia.

De todos los sueros estudiados sólo se encontraron dos con poder anticomplementario. De los 5 casos con diagnóstico parasitológico de enfermedad de Chagas se obtuvieron tres reacciones de 4 cruces y dos de 3 cruces. De los 4 sueros de leishmaniasis sólo uno fué positivo con reacción de 4 cruces, los sueros controles de personas aparentemente sanas fueron siempre negativos.

RESULTADOS OBTENIDOS CON LA REACCIÓN CUANTITATIVA. Se estudiaron los 90 sueros seleccionados en la prueba cualitativa. Para clasificarlos se siguió el criterio de FREITAS (6) que considera positivos títulos mayores de 1,9 y dudosos títulos entre 1,5 y 1,9, siendo negativos los sueros que dan una hemólisis mayor del 90 por ciento. En el Cuadro 2 se distribuyen los casos positivos por esta técnica, asumiendo que los casos negativos por la reacción cualitativa son negativos por la técnica de FREITAS. En el Cuadro 3 se analiza la frecuencia de los títulos superiores a 2,0.

Se llegó a determinar que las reacciones de 3 y 4 cruces encontradas en la prueba cualitativa dan títulos mayores o iguales a 2,0. De los 61 considerados como positivos con esa prueba se titularon sólo 59, ya que un suero resultó anticomplementario para esta técnica y del otro no se tuvo suficiente cantidad. De los 29 sueros dudosos por la técnica cualitativa 7 mostraron he-

CUADRO 1

Distribución de los casos positivos por la técnica de Kolmer

Procedencia	Nº de reacciones	Positivos (3 y 4+)	Dudosos (2+)	Porcentaje de positivos
Pacientes del Hospital San Juan de Dios	706	39	20	5,52
Donadores de sangre	221	16	4	7,24
Enfermos del Asilo Chapuí	73	6	5	8,22
Totales	1000	61	29	6,10

CUADRO 2

Distribución de los casos positivos por la técnica de Freitas considerándose como negativos los sueros que dieron fijación de menos de 2 cruces por la técnica de Kolmer. Véase texto para los detalles

Procedencia	Nº de Sueros	Positivos	Porcentaje de positivos
Pacientes del Hospital San Juan de Dios	706	41	5,80
Donadores de sangre	221	17	7,69
Enfermos del Asilo Chapuí	73	7	9,58
Totales	1000	65	6,50

mólisis mayor del 90 por ciento, 17 dieron títulos entre 1,7 y 1,9, 4 dieron títulos mayores de 1,9 y 1 no se tituló por falta de suero.

Todos los 5 casos parasitológicamente comprobados de enfermedad de Chagas usados como testigos dieron títulos mayores de 2,0. De los pacientes con leishmaniasis 3 presentaron títulos menores de 1,5 y el de reacción de 4

CUADRO 3

Distribución de frecuencia de los títulos mayores de 2,0

Título	Frecuencia
2,00 — 2,49	39
2,50 — 2,99	16
3,00 — 3,49	4
3,50 — 3,99	1
4,00 — 4,49	1
4,50 — 5,00	2

cruces en la prueba cualitativa, dió un título de 3,0. En éste caso se logró determinar la posible existencia de ambas enfermedades, ya que la paciente relata haber residido en casa con triatomas.

De los 41 pacientes del Hospital San Juan de Dios que dieron reacción positiva sólo se obtuvieron datos epidemiológicos de 35; casi todas las respuestas fueron afirmativas en cuanto a la existencia del agente vector en las respectivas habitaciones. De los catalogados como dudosos 8 aceptaron haber encontrado triatomas en sus casas.

Uno de los casos positivos resultó ser un niño recién nacido que mostró una reacción cualitativa de 3 cruces y un título por la técnica de FREITAS de 2,28 sin que se pudiera obtener ningún dato personal de la familia, por haber el niño abandonado el Hospital. Para los donadores de sangre y enfermos del Asilo Chapuí con reacciones positivas no se logró ninguna información sobre el conocimiento que tenían del transmisor.

La comparación estadística de los porcentajes de positividad según su procedencia (Cuadros 1 y 2), para cada técnica por separado, muestra que las diferencias no son significativas ($p<0,01$). El porcentaje promedio final de positividad obtenido por las dos técnicas usadas fue de 6,5.

Como se dijo anteriormente a todos los sueros se les tomó el resultado de la reacción de V. D. R. L. y de entre los 1000, 43 arrojaron resultado positivo, algunos con títulos altos, para esta reacción. Sólo un suero de estos dió resultado positivo por enfermedad de Chagas y otro se mostró dudoso, refiriendo ambos pacientes la existencia de triatomas en sus casas.

DISCUSION

El porcentaje de positividad obtenido por ZELEDÓN (28) con la técnica cualitativa es bastante menor que el nuestro si tomamos en cuenta que aquel autor consideró como positivas las reacciones de 2 cruces. Si tal no hubiere sido, el porcentaje de ZELEDÓN habría bajado a aproximadamente 2,5 para la zona endémica aunque no podríamos considerar esta cifra como definitiva, toda vez que sabemos que algunas de las reacciones de 2 cruces pueden corresponder a casos de infección chagásica. Una explicación posible entre las diferencias de las cifras de ZELEDÓN y las nuestras es que aquel autor escogió grupos de individuos de poca edad (escolares) en los cuales ha habido menos probabilidades de infección o reinfección y por consiguiente bien podría pensarse en la posibilidad de una predominancia de casos leves con tenores de anticuerpos bajos en individuos jóvenes. El trabajo que aquí se presenta se hizo en individuos de todas las edades, siendo la mayoría personas adultas y en todo caso se pudo observar la baja frecuencia con que aparecen las reacciones positivas intensas (4 cruces) ya que sólo en 11 oportunidades se obtuvo ese grado de positividad. Este dato está relacionado con la intensidad de las reacciones positivas encontradas por ZELEDÓN (l. c.).

En Brasil, BRENER (2) obtiene 31,62 por ciento de positividad en pacientes de clínicas particulares del Estado de Minas Gerais; CARVALHAL *et. al.* (3) en el Municipio de São Caetano 7,8 por ciento y PORTUGAL *et. al.* (25) en el Municipio de Itaporanga 46,67 por ciento de positivos por la reacción de fijación del complemento. En la Argentina, TORRICO (26) encuentra en pacientes cardíacos crónicos 37,5 por ciento de positivos.

En Chile, NEGHME y ROMÁN (15) obtienen 17 por ciento de positividad en habitantes de zonas rurales. En Venezuela, MAEKELT (14) en pacientes del Hospital Central de Valencia obtiene 25 por ciento de positivos en un grupo, y en otro encuentra 34 por ciento de positividad siempre con la misma reacción de fijación del complemento. Estos datos parecen indicar que, en general, los porcentajes de positividad en América del Sur, en poblaciones no seleccionadas, son bastante más altos que los obtenidos por nosotros.

En nuestro caso de 59 sueros positivos (3 y 4 cruces) titulados con la técnica cuantitativa se encontró que todos presentaron título mayor de 2,0, lo que nos indica una concordancia absoluta entre las dos pruebas. De los considerados como dudosos por la técnica de KOLMER (2 cruces) se titularon 28 sueros: 4 dieron título mayor de 2,0, 7 presentaron reacción negativa y el resto quedó incluido entre las reacciones dudosas por la técnica de FREITAS. (1,5 a 1,9). UVO *et al.* (27) hacen un estudio comparativo entre las técnicas cualitativa de Muniz y cuantitativa de Freitas. Obtienen que las reacciones positivas por esta última técnica son siempre positivas por la técnica de Muniz, mientras que reacciones dudosas o negativas por la técnica de Freitas arrojaron resultados desde negativos hasta positivos débiles (1 y 2 cruces) por la técnica cualitativa. También en nuestros resultados se puede observar el mayor grado de especificidad que presenta la prueba cuantitativa con respecto a la cualitativa, puesto que nos

permite agrupar mejor los casos considerados como dudosos en la prueba de KOLMER.

FREITAS (6) indica que los títulos positivos oscilan entre 2,0 y 10,0 siendo raros los títulos mayores. De 70 sueros positivos obtiene sólo 12 con títulos entre 2,0 y 3,0 y el resto con títulos mayores de esas cifras. Señala no haber encontrado ninguna relación entre la gravedad de la enfermedad y el título, ya que formas cardíacas graves presentaron tanto títulos altos como bajos. En nuestros casos positivos se observó que la mayoría de lo ssueros dieron títulos relativamente bajos (2,0 a 3,0) y el valor más alto fué de 4,7 el cual se obtuvo sólo en dos casos. Estos resultados están en concordancia con la intensidad de las reacciones obtenidas con la prueba cualitativa y nos confirma el bajo tenor de anticuerpos observado en nuestros casos de tripanosamiasis. Quizás la baja respuesta humoral entre nuestros chagásicos guarde alguna relación con la poca frecuencia con que pueden presentarse reinfecciones, ya que ZELEDÓN (31) refiere que el número de vectores capturados en las habitaciones es siempre pequeño en comparación a lo que ocurre en otros países de América del Sur. MAEKELT (14) en Venezuela detalla los títulos de 68 sueros positivos y aunque sólo en dos casos obtiene títulos mayores de 3,5 siempre resultan, en general, más altos que los encontrados por nosotros.

En los 5 casos de enfermedad de Chagas que habían sido diagnosticados por la presencia del parásito y usados por nosotros como controles positivos, se obtuvieron reacciones de 3 y 4 cruces con la prueba cualitativa y títulos entre 2,0 y 3,0 con la técnica de FREITAS. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en los otros sueros. De los 4 casos de leishmaniasis sólo se encontró un suero positivo con ambas técnicas, probablemente debido a la coexistencia de las dos enfermedades. Además, no se encontró ningún falso positivo en 43 sueros de posibles sifilíticos examinados.

La especificidad y sensibilidad de la reacción de fijación del complemento ha sido motivo de muchos trabajos; recientemente FREITAS (6) y PELLEGRINO y BRENER (23) afirman que la reacción de fijación del complemento con antígeno de cultivos de *S. cruzi* se comporta como negativa o dudosa en casos de leishmaniasis y que una reacción positiva en éstos casos indica una infección concomitante y no una reacción de grupo. MAEKELT (14) practica la reacción con antígeno de *S. cruzi* en casos de leishmaniasis tegumentaria y de infección por *Trypanosoma rangeli* y no obtiene ningún resultado positivo. CHAFFEE *et al.* (4) que obtienen reacciones cruzadas entre enfermedad de Chagas y leishmaniasis atribuyen esta divergencia a los métodos usados.

Como ya quedó mencionado, entre nuestras reacciones positivas está el suero de un niño recién nacido, lo que nos hace pensar en el posible pasaje de anticuerpos de la madre a través de la placenta. MAEKELT (14) logró comprobar esta transmisión de anticuerpos en 12 casos y sólo en uno de ellos pudo examinar la sangre de la madre que también dió reacción positiva. En estos casos es necesario pensar asimismo en la posibilidad de una infección chagásica congénita (10).

Las reacciones positivas obtenidas por nosotros están distribuídas en to-

das las provincias del país, correspondiendo este dato con la presencia del vector en los mismos lugares (29) y coincidiendo asimismo con la distribución de los 25 casos de enfermedad de Chagas ya comprobados en el país (31).

De los 221 sueros de donadores de sangre examinados, se obtuvieron 17 positivos (7,69%) lo cual señala un problema entre nosotros por la posible transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión de sangre. Este punto ha tomado mayor importancia desde que FREITAS *et. al.* (8) dieron a conocer los dos primeros casos de transmisión de la enfermedad por éste medio en Brasil. Posteriormente NUSSENZWEIG *et al.* (19) encuentran otro caso positivo y uno probable entre el grupo de receptores que habían sido observados por FREITAS *et al.* (1. c.).

En Brasil, PELLEGRINO (22) encuentra de 179 donadores examinados, de un Hospital de Belo Horizonte, 3 casos positivos por reacción de fijación del complemento y 2 dudosos. Posteriormente PELLEGRINO *et al.* (24) reportan 14 casos positivos y 6 dudosos de un grupo de 576 donadores; también BIANCALANA *et al.* (1) obtienen 19,1 por ciento de positividad en 233 donadores de Minas Geräis. FREITAS *et al.* (8) encuentran 35 reacciones positivas de 1623 donadores de Hospitales de São Paulo, Brasil, examinados por la técnica de Freitas; en el mismo país PASSALACQUA *et al.* (21) obtienen 4,1 por ciento de positivos y NUSSENZWEIG *et al.* (19) encuentran 1,7 por ciento. Los investigadores brasileños relacionan los porcentajes de positividad con las zonas endémicas de la enfermedad. En Venezuela, MAEKELT (14) de 449 donadores examinados obtiene 12 por ciento de positivos, por lo que indica la necesidad de practicar la reacción de fijación del complemento en la selección de donadores de sangre.

En nuestro caso el problema amerita atención, sí se toma en cuenta que la mayoría de los donadores que acuden al Hospital san Juan de Dios, son de la provincia de San José y que en el grupo aquí estudiado (149), se encontró 14 casos en reacción positiva. Esto nos hace pensar en la existencia de un buen número de portadores aparentemente sanos, que como bien dice ZELEDÓN (29) "juegan un papel epidemiológico importante", mayor aún si estas personas son admitidas como donadores de sangre.

NUSSENZWEIG et al. (18) por inoculación a ratones demostraron que la refrigeración de la sangre no mata a los tripanosomas. Varios compuestos químicos y antibióticos han sido empleados para esterilizar las sangres que se usan en transfusiones. NUSSENZWEIG *et al.* (17) han estudiado la acción de los colorantes trifenil-metánicos, violeta de genciana y cristal violeta, encontrando resultados más satisfactorios con el primero en diluciones de 1/4000, obteniendo la muerte de los flagelados después de 24 horas, tornando así la sangre apta para la transfusión. NETO y MELLONE (16) en 1959 hicieron transfusión de sangre de un caso agudo de enfermedad de Chagas, en un receptor voluntario, adicionando violeta de gencina (0,5 gm /l) 48 horas antes de la transfusión, y no observaron transmisión de la enfermedad. En el mismo año NUSSENZWEIG *et al.* (20) agregan violeta de genciana en igual concentración a 18 sangres de donadores con reacción de fijación del complemento positiva.

Estos autores dejaron actuar el colorante durante 24 horas y después de repetidos exámenes en los 18 receptores no encontraron ningún caso que contrajera la enfermedad. En vista de éstos resultados aconsejan el uso de rutina del colorante en los Bancos de Sangre para tratar aquellas sangres con reacción de fijación del complemento positiva para enfermedad de Chagas.

La importancia de donadores con reacción de fijación del complemento positiva debe siempre tenerse en mente máxime que PELLEGRINO *et al.* (24) pudieron demostrar que 3 donadores estudiados continuaban presentando xenodiagnósticos positivos varios años después de alejados de las zonas endémicas. Estamos de acuerdo con PELLEGRINO (22), al afirmar que la transfusión de sangre de donadores con reacción de fijación del complemento positiva constituye un serio peligro si tomamos en cuenta el volumen de sangre que se usa en comparación al empleado en xenodiagnósticos, hemocultivos o inoculación a animales.

AGRADECIMIENTO

La autora quiere dejar constancia de su más profundo agradecimiento al Dr. Rodrigo Zeledón por sus constantes consejos, eficiente colaboración siempre que fue necesario y por facilitarle toda la bibliografía revisada. Además, su reconocimiento al Dr. Alfonso Trejos W. por las valiosas indicaciones y facilidades prestadas, lo mismo que, al personal del Laboratorio Bacteriológico y Banco de Sangre del Hospital San Juan de Dios.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se practica la reacción de fijación del complemento para enfermedad de Chagas en 1000 sueros a saber: 706 de pacientes del Hospital San Juan de Dios, 221 de donadores de sangre del mismo Hospital y 73 del Asilo Chapuí para dementes.

Los sueros fueron sometidos primero a la técnica cualitativa de Kolmer ligeramente modificada, usando formas de cultivo de *S. cruzi* como antígeno. En los positivos (3 y 4 cruces) y dudosos (2 cruces), obtenidos por esta reacción, se practicó luego la reacción por la técnica cuantitativa de Freitas usando el 50 por ciento de hemólisis como punto de referencia. Como controles de ambas técnicas fueron usados 5 sueros de casos antiguos de enfermedad de Chagas comprobados parasitológicamente, 4 casos de leishmaniasis cutánea y 10 sueros de personas aparentemente normales.

Por la técnica de Kolmer se obtuvieron los siguientes resultados: 61 positivos (3 y 4 cruces) correspondiendo 39 a pacientes del Hospital San Juan de Dios, 16 a donadores de sangre y 6 al Asilo Chapuí, y 29 dudosos (2 cruces). Los controles de casos de triponosomiasis presentaron reacciones de 3 y 4 cruces y de los casos de leishmaniasis sólo un suero reaccionó positiva.

mente habiéndose observado que la paciente habitaba casa con triatomas.

Los resultados obtenidos con la técnica de Freitas se detallan así: de 59 positivos por la técnica de Kolmer todos mostraron títulos mayores de 2,0; de 28 dudosos por la misma técnica 4 presentaron títulos mayores de 2,0, 7 reaccionaron negativamente y 17 quedaron como dudosos (1,5 a 1,9). Los positivos por la técnica de Freitas están distribuidos así: 41 del Hospital San Juan de Dios, 17 de donadores de sangre y 7 del Asilo Chapuí. Los casos de tripanosomiasis usados como controles dieron títulos mayores de 2,0 y el caso de leishmaniasis positivo con la prueba cualitativa, dio un título de 3,0.

Se hace un análisis estadístico comparativo de los porcentajes obtenidos en el Hospital San Juan de Dios, donadores de sangre y Asilo Chapuí por ambas técnicas, y se encuentra que las diferencias no son significativas en ninguno de los casos.

Se comparan los resultados obtenidos con las dos técnicas encontrándose una concordancia absoluta entre las reacciones positivas, aunque no entre las dudosas (2 cruces), por lo que se afirma que la técnica de Freitas ofrece mayor especificidad que la técnica de Kolmer. El porcentaje final promedio de positivos, sobre los 1000 sueros, obtenido con ambas pruebas es de 6,5.

Se discute la baja frecuencia con que se obtuvieron las reacciones de 4 cruces en la prueba cualitativa y los títulos mayores de 3,0 con la técnica cuantitativa, haciendo comparaciones y comentarios con los títulos obtenidos por otros investigadores. Se atribuyen nuestros resultados a un bajo tenor de anticuerpos en los casos costarricenses de tripanosomiasis.

Se hace resaltar la especificidad de la prueba cualitativa al no obtener ningún resultado positivo falso en 43 sueros con reacción de V.D.R.L. positiva.

Se menciona la posibilidad de transmisión de anticuerpos a través de la placenta, debido al caso de un niño recién nacido con reacción de fijación del complemento positiva.

Por último se indica el peligro que constituyen los donadores de sangre con reacción de fijación del complemento positiva (7,69%), por la posible transmisión de la enfermedad durante la transfusión, y se menciona la posibilidad de obtener una esterilización completa de la sangre con violeta de genciana según trabajos de otros investigadores.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Complement fixation test for Chagas disease were carried out on 1,000 sera as follows: 706 from Hospital San Juan de Dios patients, 221 from blood donors of the same Hospital, and 73 from patients of Asilo Chapuí for the insane.

The sera were first studied employing a slight modification of Kolmer's qualitative technique, in which culture forms of *S. cruzi* were used as the antigen. Positive (3 and 4 plus) and doubtful (2 plus) sera thus obtained were analyzed

by the Freitas technique, using 50 per cent hemolysis as the reference point. As controls for both techniques, sera from 5 old cases of Chagas disease diagnosed parasitologycally, from 4 cases of cutaneous leishmaniasis, and from 10 apparently healthy persons were employed.

Using Kolmer's technique the following results were obtained: 61 positives (3 and 4 plus), corresponding 39 to patients of Hospital San Juan de Dios, 16 to blood donors, and 6 to Asilo Chapuí patients; in addition, 29 doubtful (2 plus) sera were encountered. The controls of trypanosomiasis cases gave reactions of 3 and 4 plus, and of those of the leishmaniasis cases only one serum gave a positive reaction (corresponding to a patient living a house where triatomid bugs were to be found).

The results obtained by the Freitas technique were as follows: out of 59 positive sera by the Kolmer technique all gave titers higher than 2.0; out of 28 doubtful cases using the same technique, 4 gave titers higher than 2.0, 7 gave a negative reaction, and 17 remained as doubtful (1.5 to 1.9). The positive cases as per the Freitas technique were as follows: 41 from Hospital San Juan de Dios, 17 from blood donors, and 7 from Asilo Chapuí. The trypanosomiasis cases used as controls gave titers higher than 2.0, and the qualitative test positive leishmaniasis case gave a titer of 3.0.

A comparative statistical analysis was made of the percentages obtained in cases from Hospital San Juan de Dios, blood donors, and Asilo Chapuí using both techniques, and it was found that no significant differences resulted.

The results obtained by both techniques are compared, and a perfect agrement is found among the positive reactions, although not among the doubtful ones (2 plus); hence it is concluded that the Freitas technique is more specific than the Kolmer technique. The final avarage positive percentage on 1000 sera using both techniques is 6.5.

The low frequency of 4 plus reactions obtained with qualitative technique are discussed, comparing them with the titers obtained by other researchers. Our results are attributed to the low antibody contet in the sera of Costa Rican Chagas disease cases.

The specificity of the qualitative test is commended since no single false positive test was obtained among 43 V. D. R. L. positive sera.

The possibility of transplacental passage of antiboides is mentioned in view of a case a newborn giving a positive complement fixation test.

Lastly, the danger constituted by complement fixation test positive blood donors (7.69 per cent) is pointed out in regards to the possible transmission of the disease during transfusion; mentioned is made in this regard to the possibility of obtaining complete sterilization of the blood by means of gentian violet, according to the publications of other authors.

BIBLIOGRAFIA

1. BIANCALANA, A., J. L. DE FREITAS, V. A. NETO, V. NUSSENZWEIG & R. SONNTAG.
1953. Investigações serológicas sobre doença de Chagas entre candidatos a doadores em Bancos de Sangue nos Estados de São Paulo e Minas Geräis. *O Hospital*, 44(6):745-749.

2. BRENER, Z.
1953. Dados sobre a reação de fixação do complemento no diagnóstico da doenca de Chagas. *O Hospital*, 43(6):777-780.

3. CARVALHAL, S., A. FERRACCI, A. JOUMES, O. PILAGALO, D. UVO & A. AGUIAR.
1954. Estudos sobre a moléstia de Chagas numa coletividade operaria no Municipio de S. Câetano do Sul, Estado de Sao Paulo. (Considerações clínicas e epidemiológicas). *Fol. Clin. et Biol.*, 22(1-2):9-22.

4. CHAFFEE, E. F., E. H. FIFE JR. & J. F. KENT
1956. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi*, infection by complement fixation. *Amer. Jour. Trop. Med. Hyg.*, 5(5):763-771.

5. DAVIS, D. J.
1943. An improved antigen for complement fixation in american trypanosomiasis. *Publ. Health Rep.*, 58:775-777.

6. FREITAS, J. L. P. DE
1951. Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. *Arq. Hig. Saúde Publ.*, 16(48):55-94.

7. FREITAS, J. L. P. DE & J. O. ALMEIDA
1949. Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas *O Hospital*, 35(6):787-800.

8. FREITAS, J. L. P. DE, A. BIANCALANA, V. A. NETO, V. NUSSENZWEIG, R. SONNTAG & J. G. BARRETTO.
1952. Moléstia de Chagas em Bancos de Sangue na capital de São Paulo. *O Hospital*, 41(2):229-236.

9. GUERREIRO, C. & A. MACHADO
1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como eleento diagnóstico. *Brasil Med.*, 27(23):225-226.

10. HOWARD, J. E., C. RÍOS, I. EBENSPERGER & P. OLIVOS
1957. Enfermedad de Chagas congénita. *Bol. Chileno Parasit.*, 12(3):42-45.

11. KABAT, E. A. & M. M. MAYER
1948. *Experimental inmunochemistry*. XV+567 pp. Charles C. Thomas Publ., Springfield, Illinois.

12. KELSER, R. A.
1936. A complement fixation test for Chagas disease employing an artificial ulture antigen. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 16(4):405-415.

13. KOLMER, J. A. & E. R. LYNCH
1948. Cardiolipin antigens in the Kolmer complement fixation test for syphilis. *J. Ven. Dis. Inform.*, 29:166-172.

14. MAEKELT, G. A.
1959. Contribución para el estudio de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Investigaciones serológicas de la enfermedad de Chagas mediante la reacción de fijación del complemento. *Arch. Venez. Pat. Trop. Parasit. Med.*, 3(1):252-271.

15. NEGHME, A. & J. ROMÁN
1948. Present state of Chagas disease surveys in Chile. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 28:835-839.

16. NETO, V. A. & O. MELLONE
1959. Estudo sôbre a eficacia da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas em bancos de sangue: investigaçao em voluntario, receptor de sangue de caso agudo no qual foi adicionado o corante. *O Hospital*, 55(3):343-346.

17. NUSSENZWEIG, V., R. SONNTAG, A. BIANCALANA, J. L. P. DE FREITAS, V. A. NETO & J. KLOETZEL
1953. Ação de corantes trifenil-metanicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro.* Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. *O Hospital*, 44(6): 731-744.

18. NUSSENZWEIG, V., R. SONNTAG, J. L. P. DE FREITAS, V. A. NETO, A. BIANCALANA & J. KLOETZEL
1954. Ação de agentes físicos e químicos sobre o *Trypanosoma cruzi in vitro. O Hospital*, 45(5):589-599.

19. NUSSENZWEIG, V. A. NETO, J. L. P. DE FREITAS, R. SONNTAG & A. BIANCALANA
1955. Moléstia de Chagas em Bancos de Sangue. *Rev. Hospital Clin.*, 10(4):265-283.

20. NUSSENZWEIG, V., V. A. NETO & O. MELLONE
1959. Novos dados sôbre o emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. *O Hospital*, 55(2): 183-188.

21. PASSALACQUA, C. S. P., V. A. NETO, I. ZATZ & A. DAMASCO
1953. Incidencia da doença de Chagas entre os candidatos a doadores de um Banco de Sâo Paulo. Inquérito serológico. *O Hospital*, 43(4):443-447.

22. PELLEGRINO, J.
1949. Transmissão da doença de Chagas pela transfusão de sangue. Primeras comprovações seralógicas em doadores e em candidatos a doadores de sangue. *Rev. Brasil. Med.*, 6(5):297-301.

23. PELLEGRINO, J. & Z. BRENER
1952. A reação de fixação do complemento com antigeno de formas de cultura do *S. cruzi* na leishmaniose tegumentar americana. *O Hospital*, 42(6):971-980.

24. PELLEGRINO, J., M. BORROTCHIN, G. LEITE & Z. BRENNER
1951. Inquérito sôbre a doença de Chagas em candidatos a doadores de sangue. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 49:555-564.

25. PORTUGAL, P., O. L. RAMOS, S. CARVALHAL, T. LOPES DA SILVA, N. PALADINO & H. MAFRA
1954. Inquérito clínico epidemiológico e serológico sobre moléstia de Chagas en Municipio de Itaporanga, Estado de São Paulo. *Fol. Clin. et Biol.*, 22(1-2): 69-78.

26. TORRICO, R. A.
1959. Casuística de la enfermedad de Chagas por la reacción de fijación del complemento en cardíacos del Chaco (Argentina). *An. Inst. Med. Reg.*, 5(1): 79-82.

27. UVO, D., A. AGUIAR, S. CARVALHAL, N. PALADINO & N. VALLE
1954. Estudo comparativo dos resultados da R F C para diagnóstico da moléstia de Chagas, obtidos com a realização das técnicas qualitativa e quantitativa. *Fol. Clin. et. Biol.*, 22(1-2):85-96.

28. ZELEDÓN, R.
1952. *El problema de la triponosomiasis americana o enfermedad de Chagas en Costa Rica.* Tesis, 109 pp., Minist. Salubridad Pública, San José.

29. ZELEDÓN R.
1952. Estado actual de los estudios epidemiológicos sobre enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Rev. Med. C. R.*, 11:169-179.

30. ZELEDÓN, R.
1959. Differentiation of *Trypanosoma rangeli* and *Schizotrypanum cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of hemoflagellates. *J. Parasit.*, 45(6):652.

31. ZELEDÓN, R.
1959. La enfermedad de Chagas en Costa Rica. *Rev. Goiana Med.*, 5:439-444.

32. ZELEDÓN, R.
1960. Comunicaciones personales.

ba
Th
mo
pr
pr
th
sc
th
sp
pr
7
di

L

or
d
m

—

*
1

Rev. Biol. Trop., 8 (2): 219-223, 1960

A new species of stingless bee (Meliponini) from Bolivia

by

Alvaro Wille *

(Received for publication September 15, 1960)

The three specimens (workers) on which the following description is based are from the Snow Entomological Museum of the University of Kansas. This undescribed species is especially interesting because it occupies an intermediate position between *Plebeia* Schwarz and *Schwarziana*. The latter name was proposed by MOURE (1) to include a rather isolated species, *Trigona quadripunctata* (Lepeletier); it was set apart mainly by its large size (7 mm in length), the finely granulose and dull cuticular surface of its head and thorax, its small scutellum which does not cover or only partially covers the mesal portion of the metanotum, and its large number of hamuli (8). Since the undescribed species is about 6 mm in length, its cuticular surface is between that of *Plebeia* proper and *Schwarziana*, its scutellum resembles that of *Schwarziana*, and it has 7 hamuli, *T. quadripunctata* can no longer be considered as a genus or subgenus distinct from *Plebeia* [1].

Trigona (Plebeia) intermedia, n. sp.

LENGTH: 6 mm

COLORATION: Head black, with median area of clypeus and lower half of interantennal space dark redish; mandibles yellowish with basal area black and distal border dark red; labrum yellowish. Thorax entirely black except for yellow maculations bordering thoracic notum, consisting of a narrow transverse stripe

---

* Departamento de Entomología, Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

1 Since this paper was written Pe. Jesús S. Moure, in a personal communication, has expressed the opinion that *Schwarziana* should be included in *Plebeia* (which he regards as a genus) as a subgenus.

over posterior half of pronotum and a narrow band bordering sides of mesonotum and extending brokenly over axillae and around posterior margin of scutellum. Legs black, with coxae dark redish and anterior tibiae and tarsae yellowish. Abdomen dark redish to black. Wings of a uniform, rather dull yellowish gray color.

SCULPTURE AND PUBESCENSE: Cuticular surface of head and thorax densely punctate (about 40 punctures per ocellar area on frons and about 60 on mesonotum) and polished between punctures; cuticular surface of posterior (medial) portion of propodeum glabrous except for its basal area which is slightly corrugated; first and second metasomal terga shining, punctation very sparse and delicate, slightly stronger along posterior margin of second, remaining metasomal terga smooth and shining basally but with broad, apical, punctate, hairy bands. Head and thorax hairy, with hairs of scutellum longest (length abouth twice width of flagellum).

HEAD: Width 1.2 times length; length of eye 2.6 times breadth; scape not reaching anterior ocellus; third antennal segment as long as fourth; interantennal space 1.6 times width of flagellum; clypeus convex; width of clypeus twice its length; lateral portions of espistomal suture almost straight and diverging anteriorly; length of malar space half width of flagellum; preoccipital carina absent; labrum slightly emarginate; inner third of apex of mandible bidentate; lenght of glossa greater than length of prementum; hairs of labial palpi and maxillae with straight tips.

THORAX: Length of pronotum twice width of flagellum; anterior border of pronotum slightly concave; length of mesoscutum subequal to its width; scutellum short but extending backward enough to cover mesal portion of metanotum as seen from above; width of scutellum 2.2 times its length; distance between lower metapleural suture and second coxa less than half width of flagellum; length of propodeal spiracle four times its width.

HIND LEGS: (fig. 1) Shape of tibia triangular with posterior distal extremity produced into an angle; length of tibia 2.7 times its width; corbicula occupying slightly more than half of tibia, with marginal hairs simple; inner surface of tibia with a narrow, bare posterior rim. Length of basitarsus twice its width; posterior margin of basitarsus extending apically further than anterior; inner surface of basitarsus uniformly coverd with bristles.

WINGS: (fig. 2) Length 6 mm; length of pterostigma 3.9 times its width; length of marginal cell 3.5 times its width; submarginal angle (basal angle of cell first R_1) a right angle; vein separating first and second submarginal cells relatively well indicated, that separating second and third very faintly present to virtually absent; base of first median cell non-petiolate, with vein separating first cubital and median cells transversaly placed. Hind wing with 6 or 7 hamuli; jugal lobe less than one half as long as vannal lobe.

ABDOMEN: Relatively short and wide, subtriangular in cross-section, with dorsal surface slightly convex; gonostylus cylindrical in shape, shorter than width of flagellum.

DIAGNOSTIC CHARACTERS: Especially differentiated from other species of *Plebeia* including the subgroup formerly called *Schwarziana* by the following combination of characters: Cuticular surface of head, thorax, and distal portions of last metasomal segments densely punctate (40 to 60 punctures per ocellar area) and polished between punctures; basal area of propodeum slightly corrugated; 6 or 7 hamuli.

TYPE MATERIAL: Holotype from Yungas del Palmar, Bolivia, June 10, 1950 (Zischka); two paratypes with the same data. The holotype and one headless paratype are in the Snow Entomological Museum of the University of Kansas, the other paratype will be deposited in the collection of Padre J. S. Moure, University of Paraná, Curitiba, Brasil.

SUMMARY

A new species of stingless bee, *Trigona* (*Plebeia*) *intermedia*, occupying an intermediate position between *Plebeia* and *Schwarziana*, is described from Yungas del Palmar, Bolivia.

RESUMEN

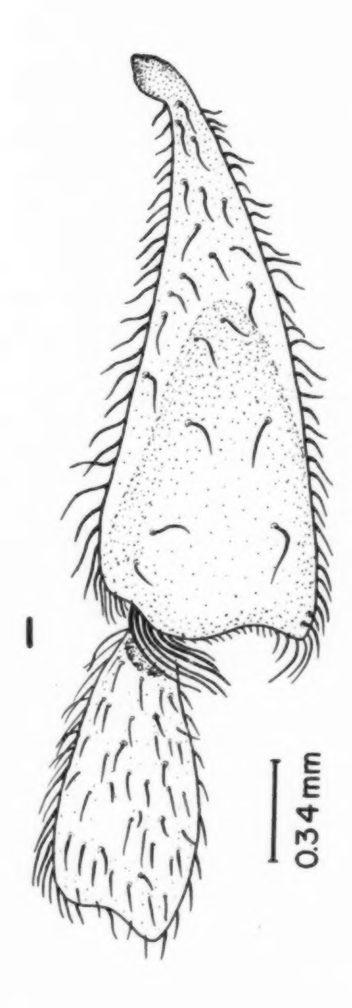
En este trabajo se describe una nueva especie de Melipónido, *Trigona* (*Plebeia*) *intermedia*, la cual es intermedia entre los subgrupos *Plebeia* y *Schwarziana*, por lo que se sugiere la eliminación taxonómica del último subgrupo.

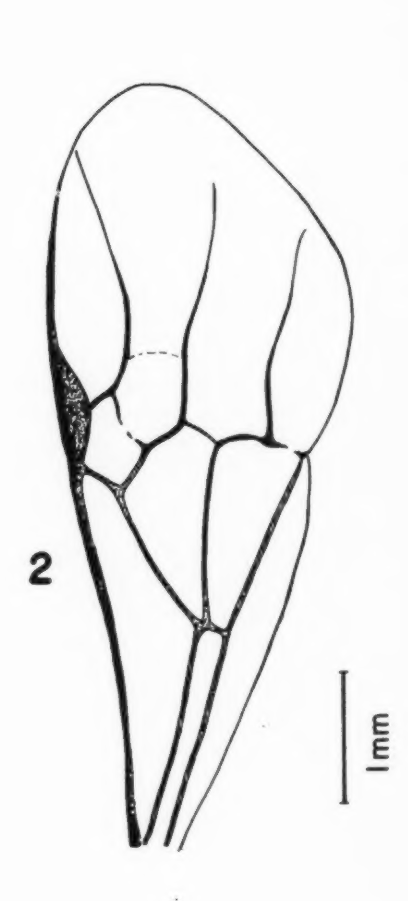
LITERATURE CITED

1. MOURE, P. J. S.
1943. Abelhas de Batatais (Hym. Apoidea). *Arq. Mus. Paranaense*, 3:1461147.

Fig. 1: outer surface of left hind tibia and basitarsus.

Fig. 2: right fore wing, hairs omitted.


1
0.34 mm


2
1 mm

Sc

tidos
ferm
Tryp
chag
plea

uso
con
ros
poco
teína
com
intr

y cu
dad
cual

*
**

Rev. Biol. Trop., 8(2):225-231, 1960

Estudio comparativo entre los antígenos de Schizotrypanum cruzi y de Strigomonas oncopelti en la reacción de fijación del complemento para enfermedad de Chagas

por

Angeles Berrios* y Rodrigo Zeledón**

(Recibido para su publicación el 20 de setiembre de 1960)

Varios investigadores han empleado antígenos de diversos tripanosomátidos en la reacción de fijación del complemento para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. MUNIZ en 1930 (5) demuestra que un antígeno de *Trypanosoma equiperdum* fijaba el complemento en presencia de sueros de chagásicos. Posteriormente MUNIZ y FREITAS (6) demuestran lo mismo empleando antígenos de *Leishmania brasiliensis* y *T. equinum*.

En el presente trabajo damos a conocer los resultados obtenidos con el uso de un antígeno de *S. oncopelti*, parásito de insectos fitófagos, comparado con el antígeno homólogo en la reacción de fijación del complemento con sueros de presuntos chagásicos. Por ser *S. oncopelti* un organismo relativamente poco exigente, fácilmente cultivable en medios líquidos comunes libres de proteínas, y aún en un medio sintético (8), la posibilidad de que pudiera sustituir como antígeno al preparado a partir de *S. cruzi* nos hizo pensar que su uso introduciría ventajas técnicas en la reacción mencionada.

MATERIAL Y METODOS

Para las reacciones se siguieron las técnicas cualitativa de KOLMER (4) y cuantitativa de FREITAS (2) ligeramente modificadas. Los detalles han sido dados en una publicación aparte (1). Se seleccionaron 57 sueros por la técnica cualitativa que dieron una fijación con antígeno de *S. cruzi* así: 10 de 4 cruces,

---

* Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
** Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica.

31 de 3 cruces y 16 de 2 cruces. De estos sueros 30 (6 de 4 cruces, 22 de 3 cruces y 2 de 2 cruces) se probaron de nuevo para el antígeno homólogo y para el antígeno de *S. oncopelti*. Además, se incluyeron sueros controles de 5 casos de enfermedad de Chagas comprobados parasitológicamente, de 8 casos de leishmaniasis cutánea (6 curados y 2 activos) y 3 sueros de personas aparentemente normales. En la reacción cuantitativa probamos todos los 57 sueros mencionados contra extractos de antígenos de ambos parásitos. Para esta técnica se usaron los mismos controles mencionados arriba.

Para ambas técnicas los antígenos fueron preparados en medio líquido (9). En la prueba cualitativa se empleó 0,2 ml de una suspensión de *S. cruzi* preparada a partir de un volumen de flagelados más 39 volúmenes de solución salina mertiolatada y como antígeno de *S. oncopelti* se usó de 0,2 a 0,4 ml de una suspensión de un volumen de flagelados más 19 volúmenes de solución salina mertiolatada. Para la prueba cuantitativa las cantidades de antígeno usadas en la reacción final fueron: en el caso de *S. cruzi* 0,1 ml de una dilución 1/20 y en el caso de *S. oncopelti* 0,1 ml de una dilución 1/10. Esta cantidad usada del antígeno heterólogo fue la que en presencia de sueros positivos dió una fijación comparable a la dada por el antígeno homólogo.

RESULTADOS

Con la prueba cualitativa se verificó la intensidad de la reacción de los sueros positivos con el antígeno homólogo, que no dió reacciones cruzadas con los sueros de leishmaniasis excepto en dos de ellos de pacientes con posible tripanosomiasis concomitante (4 cruces). Los casos de enfermedad de Chagas usados como controles dieron todos fuerte fijación (3 y 4 cruces) y los sueros normales mostraron reacción negativa. El antígeno de *S. oncopelti* fue incapaz de fijar el complemento en presencia de ninguno de los sueros mencionados.

Los resultados obtenidos por la técnica cuantitativa para ambos antígenos están expresados en el cuadro 1. En el cuadro 2 se analiza la distribución de los títulos de los sueros positivos con esta técnica. En el cuadro 3 se comparan los títulos de 7 sueros seleccionados por presentar una diferencia mayor de 0,5. Además, varios de los sueros positivos con antígeno homólogo dieron títulos dudosos para el heterólogo y en un único caso se obtuvo un título fuertemente positivo con *S. oncopelti* y dudoso con *S. cruzi* (cuadro 4). En los cuadros 5 y 6 se presentan, también comparativamente, los títulos obtenidos en los casos de tripanosomiasis y de leishmaniasis usados como testigos.

DISCUSION

Los antígenos heterólogos que hasta ahora habían sido empleados en la reacción de fijación del complemento de tipo Kolmer para enfermedad de Chagas, se habían encontrado tan efectivos como el antígeno homólogo (5, 6). Los estudios aquí expuestos permiten determinar que un antígeno preparado a partir de *S. oncopelti* no en capaz de fijar el complemento en presencia de sue-

CUADRO 1

Resultado de las reacciones por la técnica cuantitativa para ambos antígenos.

Antígeno	Nº de reacciones	Positivas (>1,9)	Dudosas (1,5 a 1,9)	Negativas
S. cruzi	57	44	11	2
S. oncopelti	57	41	11	5

CUADRO 2

Distribución de frecuencias de títulos positivos con la técnica cuantitativa para ambos antígenos.

Título	*S. cruzi*	*S. oncopelti*
2,00 — 2,49	26	33
2,50 — 2,99	11	6
3,00 — 3,49	5	1
3,50 — 3,99	0	1
4.00 — 4,49	0	0
4,50 — 5.00	2	0

CUADRO 3

Comparación de casos positivos con ambos antígenos pero con títulos diferentes en más de 0,5. Las cifras expresadas son un promedio de dos determinaciones independientes para cada caso.

S. cruzi	*S. oncopelti*
2,0	3,4
2,5	2,0
3,0	2,1
3,0	2,5
3,2	2,4
4,7	2,3
4,7	2,4

CUADRO 4

Análisis de los casos positivos para un antígeno y dudosos para el otro o viceversa. Las cifras expresadas son un promedio de dos determinaciones independientes para cada caso.

S. cruzi	*S. oncopelti*
1,8	3,8
2,4	1,9
2,4	1,9
2,5	1,4
2,7	1,7
2,9	1,9

CUADRO 5

Títulos de los casos de tripanosomiasis crónica parasitológicamente comprobada usados como testigos. Las cifras expresadas son un promedio de dos o tres determinaciones independientes para cada caso.

S. cruzi	*S. oncopelti*
2,2	2,1
2,4	2,2
2,7	2,5
2,8	2,4
3,0	2,8

CUADRO 6

Títulos de casos de leishmaniasis usados como testigos. Las cifras expresadas son un promedio de dos determinaciones independientes para cada caso.

S. cruzi	*S. oncopelti*
1,6	1,9
1,4	2,0
1,5	2,0
1,5	2,3
1,4	2,5
1,6	4,1
2,7	4,1
3,0	5,3

ros de chagásicos por una técnica del mismo tipo. En un estudio hecho por MUNIZ y FREITAS (7), en donde expresan haber extraído polisacáridos de diversos tripanosomátidos de invertebrados, incluyendo *Leptomonas oncopelti* (= *S. oncopelti*) y haberlos probado contra diversos antisueros, los autores llegan a la conclusión de que estos antígenos no reaccionan con antisueros contra flagelados de vertebrados en prueba de precipitinas. Por otro lado la reacción es cruzada entre los diversos polisacáridos y antisueros preparados a partir de los parásitos de vertebrados por ellos empleados. Este tipo de reacción, aunque distinto del que nos ocupa, pareciera indicar importantes diferencias antigénicas entre tripanosomátidos de vertebrados y de invertebrados, ahora parcialmente confirmadas con nuestros resultados usando suspensiones de flagelados.

El antígeno de *S. oncopelti* previamente tratado con benceno según la técnica de FREITAS y ALMEIDA (3), sí fue capaz de fijar el complemento en presencia de sueros de chagásicos siguiendo la técnica cuantitativa (2); sin embargo, este antígeno dió títulos en general más bajos que los obtenidos con el antígeno homólogo lo cual hizo que 3 de las reacciones consideradas como positivas con antígeno de *S. cruzi* fueran negativas con antígeno de *S. oncopelti.*

En el caso de los sueros de individuos que habían padecido leishmaniasis cutánea los títulos con antígeno de *S. oncopelti* se muestran más altos que con antígeno de *S. cruzi;* la mayoría de estos casos alcanzaron títulos superiores a 2,0 con el primero y sólo en dos pacientes, en los cuales se sospechó infección chagásica concomitante, la reacción mostró títulos superiores a esa cifra en presencia de antígeno de *S. cruzi.*

Los resultados obtenidos con la reacción cuantitativa nos muestran que, si bien el antígeno de *S. oncopelti* puede fijar el complemento en presencia de sueros de chagásicos no nos permitiría sin embargo diagnosticar un cierto número de ellos. Por otro lado el antígeno se comporta como menos específico para el diagnóstico de enfermedad de Chagas aumentando las falsas reacciones positivas de grupo.

RESUMEN

Se practica comparativamente la reacción de fijación del complemento con antígenos preparados a partir de formas de cultivo de *S. cruzi* y de *S. oncopelti* por las técnicas cualitativa de KOLMER y cuantitativa de FREITAS ligeramente modificadas. Se emplean 57 sueros positivos (3 y 4 cruces) y dudosos (2 cruces) seleccionados por la técnica de KOLMER con antígeno de *S. cruzi* y como controles se incluyen los sueros de 5 casos comprobados de enfermedad de Chagas, de 8 de leishmaniasis cutánea y 3 de personas normales. El antígeno de *S. oncopelti* se mostró incapaz de fjar el complemento por la técnica cualitativa. Por la técnica de FREITAS el antígeno heterólogo dió reacciones, en general, con títulos más bajos y se mostró menos específico al reaccionar más intensamente que el antígeno de *S. cruzi* en presencia de los sueros de casos de leishmaniasis tegumentaria.

SUMMARY

Complement fixation test using culture forms of *Schizotrypanum cruzi* and *Strigomonas oncopelti* as the antigens were carried out and compared employing the Kolmer qualitative and the Freitas quantitative techniques, both slightly modified. 57 positive (3 and 4 plus) and doubtful (2 plus) sera were used, selected by the Kolmer technique using *S. cruzi* as the antigen and sera of 5 cases of verified Chagas disease, of 8 cases of cutaneous leishmaniasis, and of 3 normal individuals were employed as the controls. The *S. oncopelti* antigen did not fix complement in the qualitative test. Using the Freitas technique, the heterologous antigen gave, in general, lower titers and was less specific since it reacted more strongly than the *S. cruzi* antigen against sera of cases of cutaneous leishmaniasis.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean dejar constancia de su agradecimiento a la Dra. Helene A. Nathan, de Haskins Laboratories, New York, por haber facilitado la cepa de *S. oncopelti* con que trabajaron.

BIBLIOGRAFIA

1. BERRÍOS, A.
1960. Investigaciones sobre enfermedad de Chagas en Costa Rica por la reacción de fijación del complemento. *Rev. Biol. Trop.*, 8(2):203-218.

2. FREITAS, J. L. P. DE
1951. Reação de fixação do complemento para diagnóstico da moléstia de Chagas pela técnica quantitativa. *Arq. Hig. Saúde Publ.*, 16 (48): 55-94.

3. FREITAS, J. L. P. DE & J. O. ALMEIDA
1949. Nova técnica de fixação do complemento para moléstia de Chagas. *O Hospital*, 35 (6): 787-800.

4. KOLMER, J. A. & E. R. LYNCH
1948. Cardiolipin antigens in the Kolmer complement fixation test for syphilis. *J. Ven. Dis. Inform.*, 29: 166-172.

5. MUNIZ, J.
1930. Del uso del antígeno de Watson (*T. equiperdum*) en la reacción de desviación del complemento en la enfermedad de Chagas. 5ª *Reunión Soc. Patol. Reg.*, 2: 897.

6. MUNIZ, J. & G. DE FREITAS
1944. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. I Estudo comparatorio entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 41 (2): 303-333.

7. MUNIZ, J. & G. DE FREITAS
1944. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II Isolamento de polisacarideos do *S. cruzi* e de outros tripanosomideos, seu comportamento nas reações de precipitação, de fixação do complemento e de hipersensibilidade. Os test de floculação (sublimado e formol gel). *Rev. Bras. Biol.*, 4 (4): 421-438.

8. NEWTON, B. A.
1956. A synthetic growth medium for the trypanosomid flagellate *Strigomonas* (*Herpetomonas*) *oncopelti*. *Nature*, 177: 279-280.

9. ZELEDÓN, R.
1959. Differentiation of *Trypanosoma rangeli* and *Schizotrypanum cruzi* in a liquid medium, with notes on the nutrition of hemoflagellates. *J. Parasit.*, 45 (6): 652.

Rev. Biol. Trop., 8(2):233-237, 1960

Helmintos de la República de Costa Rica XVI. Parallopharynx gonzalezi n. sp. (Trematoda: Plagiorchidae)[1]

por

Rodrigo Ramón Brenes* Guido Arroyo**

y

F. Montero-Gei***

(Recibido para su publicación el 21 de setiembre de 1960)

Familia.—PLAGIORCHIDAE Lühe, 1901
Sub-familia.—Plagiorchinae Pratt, 1902
Parallopharynx gonzalezi n. sp.

El material que forma parte del presente trabajo fue colectado por el personal del Departamento de Laboratorios de Salud Pública en Río Grande, a 7 Kms al sur del centro de Atenas, Provincia de Alajuela.

Numerosos ejemplares se hallaron en el intestino delgado de un "gallego", *Basiliscus* sp. y de una "iguana", *Ctenosaura similis similis*. La descripción se basó en cuatro ejemplares teñidos con carmín acético y montados en preparaciones totales.

Los trematodos tienen el cuerpo elongado con los extremos romos, más ancho el anterior que el posterior: miden 6,130 mm a 6,350 mm de largo por

1. Esta especie la dedicamos al Profesor y Decano de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica, Lic. Gonzalo González G.

* Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
** Laboratorio de Investigaciones Médico-Veterinarias, Ministerio de Agricultura e Industrias, San José, Costa Rica.
*** Departamento Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salubridad Pública, San José, Costa Rica.

0,812 mm a 1,019 mm de ancho. Cutícula sin espinas. Ventosa oral subterminal y musculosa, con cavidad bucal a modo de herradura, mide 0,110 mm a 0,179 mm de largo por 0,234 mm a 0,238 mm de ancho. El acetábulo se sitúa en el tercio anterior, a una distancia de 0,813 mm de la extremidad anterior, por detrás del poro genital y mide 0,179 mm de largo por 0,192 mm de ancho; la relación que existe entre la ventosa oral y el acetábulo es de 1:10 x 1:80 a 1:1,12 x 1:1,16.

La cavidad bucal mide 0,082 mm a 0,096 mm de diámetro; la faringe es de forma ovoide, presentando dos masas laterales y mide 0,147 mm a 0,192 mm de largo por 0,138 mm a 0,192 mm de ancho. No se observó esófago.

Los ciegos intestinales, se extienden lateral y dorsalmente hasta el extremo posterior del cuerpo y miden el derecho, 5,512 mm a 5,892 mm de largo por 0,096 mm de ancho y el izquierdo 5,429 mm a 5,892 mm de largo por 0,082 mm de ancho. El poro genital es preacetabular, intercecal y dista 0,647 mm a 0,689 mm del extremo anterior y 0,018 mm a 0,022 mm del borde superior del acetábulo.

Los testículos son ovoides, intercecales, situados uno delante del otro, casi en el mismo campo y en el tercio posterior del cuerpo del parásito; separados entre sí por algunas asas uterinas; el testículo anterior mide 0,248 mm a 0,372 mm de largo por 0,482 mm a 0,537 mm de ancho y el posterior 0,330 mm a 0,385 mm de largo por 0,496 mm a 0,537 mm de ancho. La bolsa del cirro es grande, intercecal y se extiende desde un nivel posterior al metratermo hasta el poro genital y mide 0,813 mm a 0,909 mm de largo por 0,220 mm a 0,427 mm de ancho.

El ovario es ovoide, intercecal y localizado delante del testículo anterior, en posición preecuatorial y mide 0,192 mm a 0,248 mm de largo por 0,316 mm a 0,427 mm de ancho. El receptáculo seminal es ovoide o esférico, situado inmediatamente debajo del ovario y mide 0,087 mm a 0,161 mm de largo por 0,087 mm a 0,096 mm de ancho.

El útero está constituido por dos ramas, una ascendente y otra descendente y por numerosas asas transversales, ventrales y dorsales, cecales e intercecales, que se extienden desde el nivel posterior de los ciegos hasta la bolsa del cirro para formar el metratermo, que mide 0,496 mm a 0,620 mm de largo por 0,124 mm a 0,137 mm de ancho.

Los huevecillos son ovoides, operculados y miden 0,023 mm de largo por 0,013 mm a 0,018 mm de ancho.

Las glándulas vitelinas están constituidas por numerosos folículos, que se agrupan en 6 grupos de masas foliculares, extra e intracecales que se extienden desde un nivel que constituye la mitad de la distancia entre el ovario y el acetábulo hasta sobrepasar al testículo posterior. Las tres primeras masas, están muy unidas entre sí y las restantes se encuentran bien separadas unas de otras. Los primeros folículos se sitúan a una distancia de 0,620 mm a 0,800 mm del borde inferior del acetábulo y los últimos folículos a 1,157 mm del extremo posterior del parásito y miden 0,026 mm a 0,055 mm de largo por 0,026 mm a 0,041 mm de ancho.

HUÉSPED: *Basiliscus* sp. y *Ctenosaura similis similis.*

LOCALIZACIÓN: Intestino delgado.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA: Río Grande, Atenas, Provincia de Alajuela.

EJEMPLARES: Holotipo en la colección de Helmintología, Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica, Nº 200-27. Paratipos en el Departamento Laboratorios de Salud Pública, Ministerio de Salubridad Pública.

DISCUSION

El género *Parallopharynx* fue establecido por CABALLERO (1) para designar una especie encontrada en el intestino delgado de *Basiliscus vittatus*: *P. arctus* Caballero, 1946.

Al estudiar nuestros ejemplares de *Parallopharynx* hemos notado algunas diferencias con la especie de Caballero que a continuación anotamos: tamaño, diferente relación entre la ventosa oral y la ventral, distinta forma, tamaño y posición de los testículos y del ovario; diferente forma y tamaño del receptáculo seminal y ordenamiento de las glándulas vitelinas. Por lo anterior consideramos que nuestros especímenes pertenecen a una nueva especie: *P. gonzalezi.*

RESUMEN

En esta contribución se describe una nueva especie del género *Parallopharynx* Caballero, 1946: *P. gonzalezi*, que parasita además de *Basiliscus* sp. a *Ctenosaura similis similis*, que se considera un nuevo huésped para este género.

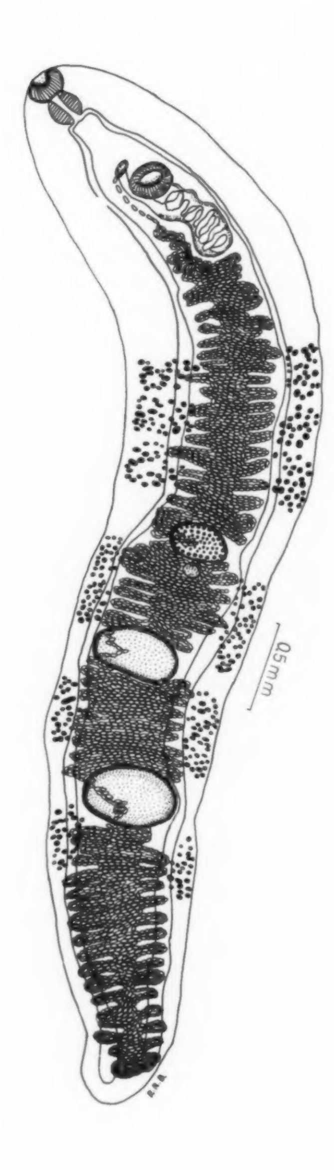
SUMMARY

A new species, *Parallopharynx* is described. This species formely found in *Basiliscus* sp., is reported for *Ctenosaura similis similis* here considered as a new host for the genus.

BIBLIOGRAFIA

1. CABALLERO Y C., E.
1946. Estudios helmintológicos de la región onchocercosa de Guatemala Trematoda II. Presencia de *Paragonimus* en reservorios naturales y descripción de un nuevo género. *An. Inst. Biol. Mex.*, 17 (1-2): 137-165.

Fig. 1: Dibujo de una preparación total de *Parallopharynx gonzalezi* n. sp. Región ventral (Holotipo).


0.5 mm

I

bro
tota

mm
mid

---

*
**

***

Rev. Biol. Trop., 8(2):239-245, 1960

Helmintos de la República de Costa Rica XVII. Descripción de Ochetosoma bravoi n. sp. y redescripción de Glypthelmins palmipedis (Lutz, 1928) Travassos, 1930.

por

Rodrigo Ramón Brenes* y Guido Arroyo**

(Recibido para su publicación el 30 de setiembre de 1960)

Familia.—OCHETOSOMATIDAE Leao, 1945
Sub-familia.—Ochetosomatinae Leao, 1945
Ochetosoma bravoi n. sp.

La presente descripción se basó en dos ejemplares colectados en un miembro de la familia Colubridae (no identificado), y montados en preparaciones totales.

Trematodos piriformes que miden 3,556 a 4,673 mm de largo por 1,270 mm a 1,422 mm de ancho. Cutícula cubierta en su totalidad por espinas que miden 0,009 mm de largo por 0,004 mm de ancho. La ventosa oral es casi

---

* Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
** Laboratorio de Investigaciones Médico Veterinarias, Ministerio de Agricultura e Industrias, San José, Costa Rica.
*** Esta especie la dedicamos con aprecio y estimación a la distinguida maestra e investigadora del Laboratorio de Helmintología del Instituto Biología de la U. N. A. M., Margarita Bravo-Hollis.

esférica, subterminal, fuerte y musculosa, mide 0,592 a 0,620 mm de largo por 0,564 mm de ancho. El acetábulo es también subesférico, más grande que la ventosa oral y situado un poco hacia arriba de la línea media del parásito, mide 0,606 a 0,702 mm de largo por 0,689 a 0,730 mm de ancho. La relación entre los diámetros de las ventosas es de: 1:1,02 × 1:1,13 a 1:1,22 × 1:1,29.

La faringe es globosa y situada inmediatamente debajo de la ventosa oral, mide 0,234 a 0,248 mm de largo por 0,261 mm de ancho. El esófago es corto y mide 0,137 mm de largo por 0,151 a 0,179 mm de ancho.

Los ciegos intestinales se extienden desde el arco bifurcal hasta la zona ecuatorial, formando un arco, con ambas extremidades más anchas y festoneadas. El ciego derecho es ligeramente más largo que el izquierdo, bordea el asa subterminal uterina y mide 1,364 a 1,846 mm de largo por 0,096 a 0,134 mm de ancho. El izquierdo mide 1,364 a 1,626 mm de largo por 0,137 a 0,147 mm de ancho y se extiende hasta llegar un poco delante del testículo del mismo lado. Los testículos son masiformes, localizados oblicuamente, en posición postecuatorial, separados por algunas asas uterinas y miden, el testículo derecho 0,523 a 0,647 mm de largo por 0,289 a 0,385 mm de ancho; el izquierdo 0,372 a 0,523 mm de largo por 0,179 a 0,275 mm de ancho.

La bolsa del cirro es ampuliforme y grande, localizada post-bifurcalmente y en el área comprendida entre el ciego derecho, borde superior acetabular, sobrepasando el ciego izquierdo, mide 0,881 a 1,157 mm de largo por 0,271 a 0,275 mm de ancho. El poro reproductor se localiza marginalmente en posición lateral izquierda, a nivel de la porción media o distal de la faringe. El ovario es ovoide situado cerca del borde lateral derecho del acetábulo y mide 0,290 a 0,303 mm de largo por 0,212 a 0,261 mm de ancho.

Las glándulas vitelinas, están constituídas por masas foliculares lateralmente, en dos columnas que se extienden, la derecha al nivel del esófago hasta el borde inferior del testículo del mismo lado y la izquierda, desde un nivel inferior a la bolsa del cirro, hasta el borde inferior del testículo. La mayoría de los folículos son extracecales. También se observan con mucha facilidad los viteloductos.

El útero está constituído por dos ramas, ascendente y descendente, que constituyen algunas asas que se extienden desde la extremidad posterior hasta el acetábulo en donde se continúa por un metratermo, que termina en el poro genital.

Los huevecillos son ovoides, operculados y miden 0,036 mm de largo por 0,018 a 0,023 mm de ancho.

DISCUSIÓN: Para el estudio de nuestros ejemplares, hemos revisado los trabajos de KAGAN (6), FLORES BARROETA *et al.* (5), PÉREZ (9), SKRJABIN (8), YAMAGUTI (10), BRENES *et al.* (1).

Al comparar nuestros ejemplares, con las descripciones y las figuras de los trabajos anteriormente citados, hemos encontrado los siguientes caracteres diferenciales: tamaño y forma del cuerpo, cutícula, forma y longitud del esófago, forma y extensión de los ciegos, posición y tamaño del acetábulo, tamaño, forma y posición de los testículos y del ovario, forma y extensión de las viteli-

nas y útero, posición del poro genital.

Todos estos caracteres, nos han decidido a considerar nuestros ejemplares como pertenecientes a una nueva especie: *Ochetosoma bravoi.*

Huésped: Ejemplar de la familia Colubridae. No identificado.

Distribución geográfica: Escazú, Provincia de San José, Costa Rica.

Localización: Esófago.

Ejemplares: En la colección de helmintología del Laboratorio de Investigaciones Médico Veterinarias con el N° 50-47 y en la del Laboratorio de Helmintología, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología con el N° 200-28.

Familia.—PLAGIORCHIDAE Lühe, 1901
Sub-familia.—Plagiorchinae Pratt, 1902
Glypthelmins palmipedis (Lutz, 1928) Travassos, 1930.

La redescripción se basó en un solo ejemplar encontrado en un sapo de la provincia de Puntarenas y montado en preparación total. Cuerpo oblongo, más ancho en su extremidad anterior que en la posterior; mide 4,318 mm de largo por 1,168 mm de ancho.

Cutícula transparente y sin espinas. La ventosa oral es subterminal y musculosa; más grande que el acetábulo y mide 0,354 mm de largo por 0,331 mm de ancho. El acetábulo se sitúa en el tercio anterior del cuerpo del parásito, por delante de los testículos y mide 0,230 mm de largo por 0,216 mm de ancho. La relación entre los diámetros de las ventosas es de 1:1,53 × 1:1,57.

La faringe es globosa y musculosa, más ancha que larga y mide 0,179 mm de largo por 0,198 mm de ancho. El esófago es corto y mide 0,115 mm de largo por 0,151 mm de ancho. Los ciegos intestinales son largos y se extienden lateralmente hasta la extremidad posterior.

El ciego izquierdo, es más largo que el derecho y mide 3,454 mm de largo por 0,096 mm de ancho; el ciego derecho mide 3,200 mm de largo por 0,082 mm de ancho. La distancia del ciego izquierdo al borde posterior del cuerpo es de 0,165 mm y la del derecho es de 0,582 mm. Los testículos son redondos, de bordes regulares, postovarianos y situados oblicuamente; el testículo derecho mide 0,299 mm de largo por 0,216 mm de ancho y el izquierdo 0,267 mm de diámetro. El ovario es casi esférico y situado en el borde lateral derecho del acetábulo, mide 0,304 mm de largo por 0,285 mm de ancho. El receptáculo seminal es pequeño y situado ligeramente debajo del ovario, redondo y mide 0,110 mm de diámetro.

La bolsa del cirro es pequeña y se localiza delante del acetábulo, mide 0,424 mm de largo por 0,115 mm de ancho. El poro genital se localiza en la zona preacetabular y dista 1,349 mm del borde anterior del cuerpo. El útero

está constituído por dos ramas una ascendente y otra descendente, que se extienden desde el borde anterior del acetábulo, hasta un poco más allá de la terminación de los ciegos intestinales, formando numerosas asas cecales e intracecales. Las glándulas vitelinas están constituídas por numerosos folículos, extracecales o parcialmente cecales que se extienden desde un nivel un poco delante del poro genital, hasta el inicio del cuarto posterior del parásito. Los huevecillos operculados muy numerosos llenan por completo las asas uterinas y miden 0,032 mm de largo por 0,013 mm de ancho.

DISCUSIÓN: Revisando los trabajos de CABALLERO (3), FAHEL (4), SKRJABIN (7), BRENES *et al.* (2), hemos llegado a la conclusión de que nuestros ejemplares corresponden a *Glypthelmins palmipedis* (Lutz, 1928) Travassos, 1930, en base a la extensión de las glándulas vitelinas, bolsa del cirro, útero y otros datos mensurables.

Esta especie ha sido reportada por vez primera en Venezuela, luego en Brasil (São Paulo, Mato Grosso), Uruguay y Argentina.

HUÉSPED: *Bufo marinus* (L.).

LOCALIZACIÓN: Intestino delgado.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA: Chapernal, Provincia de Puntarenas, Costa Rica.

EJEMPLARES: Uno en la colección de Helmintología, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología con el N° 200-29.

RESUMEN

En esta nueva contribución, describimos *Ochetosoma bravoi* n. sp. encontrada en esófago de un miembro de la familia Colubridae y se redescribe a *Glypthelmins palmipedis* (Lutz, 1928) Travassos, 1930 con lo que se amplía su distribución geográfica a Centro América.

SUMMARY

Ochetosoma bravoi n. sp. is described as a parasite of the oesophagus of a Colubridae snake. The presence of *Glypthelmins palmipedis* (Lutz, 1928) Travassos, 1930 in a Costa Rican toad is reported, therefore its geographic distribution is widened to Central America.

BIBLIOGRAFIA

1. BRENES, R. R., G. ARROYO & E. DELGADO
1959. Helmintos de la República de Costa Rica XI. Sobre la validez del género *Langeronia* Caballero y Bravo, 1949 (Trematoda: Lecithodendriidae) y ha-

llazgo de *Ochetosoma miladelarocai* Caballero y Vogelsang, 1947. *Rev. Biol. Trop.*, 7 (1): 81-87.

2. BRENES, R. R., G. ARROYO, O. JIMÉNEZ-QUIRÓS & E. DELGADO
1959. Helmintos de la República de Costa Rica XIII. Algunos tremátodos de *Rana pipiens*. Descripción de *Glypthelmins facioi* n. sp. *Rev. Biol. Trop.*, 7 (2): 191-197.

3. CABALLERO Y C., E.
1938. Revisión y Clave de las especies del Género *Glypthelmins*. *An. Inst. Biol. Mex.*, 9 (1-2): 121-149.

4. FAHEL, J.
1952. Fauna helmintológica das "Gias" de Salvador *(Leptodactylus pentadactylus* (Laur). *An. Acad. Brasil. Ciencias*, 24 (4): 389-436.

5. FLORES BARROETA, L. & R. C. GROCOTT
1953. Helmintos de la República de Panamá VIII. Sobre dos tremátodos del género *Ochetosoma* Braun, 1901. *An. Escuela Nac. Ciencias Biol.*, 7(1-4): 9-14.

6. KAGAN, I. G.
1947. A new species of *Renifer* (Trematoda) from the king snake *Lampropeltis getulus*, with an emendation of the genus *Renifer* Pratt, 1903. *J. Parasit.*, 33 (5): 427-432.

7. SKRJABIN, K. I.
1947. *Trematody jivotnyj i cheloveka. Osnovy trematodologii* XIV + 934 pp. Isdatelstvo Akademii Nauk S. S. S. R. Moskva.

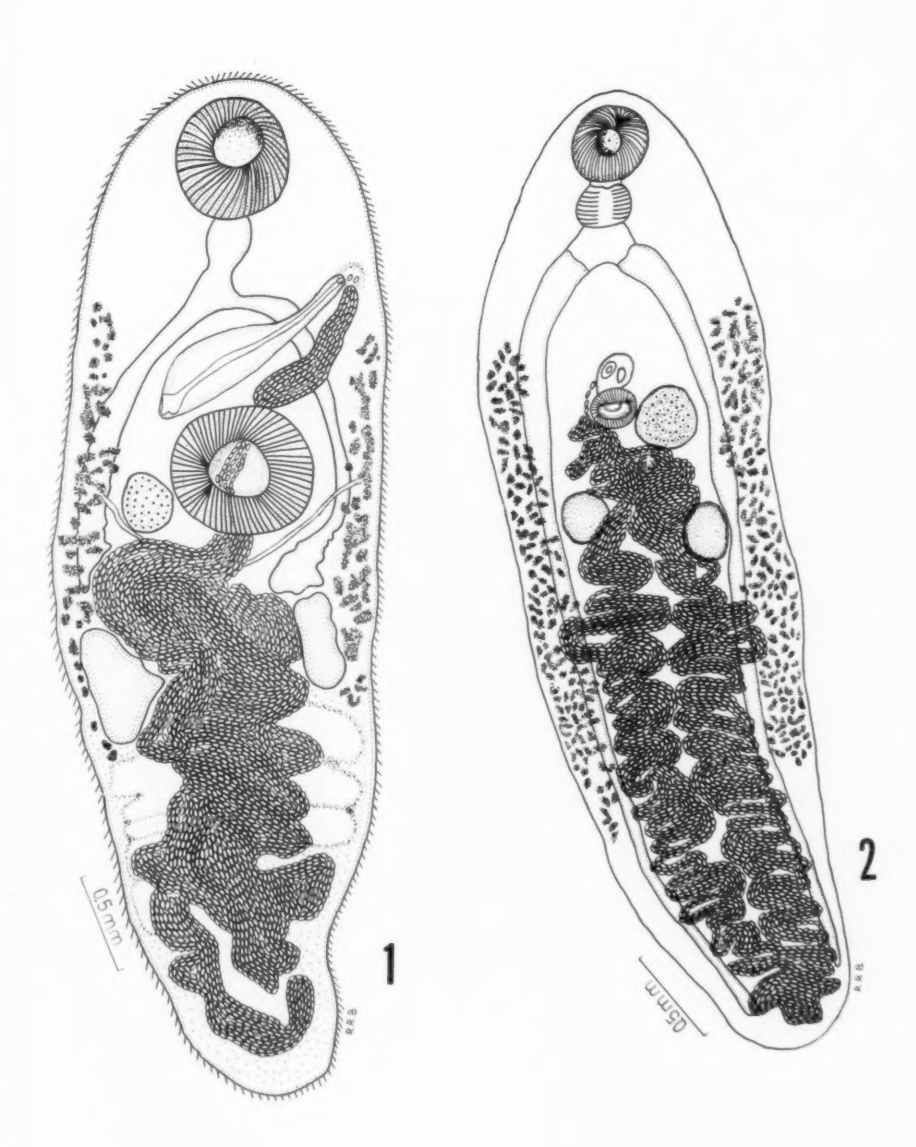
8. SKRJABIN, K. I.
1957. *Trematody jivotnyj i cheloveka. Osnovy trematodologii.* XIII + 783 pp. Isdatelstvo Akademii Nauk S. S. S. R. Moskva.

9. PÉREZ V., I.
1956. Contribución al conocimiento de la fauna helmintológica cubana, *Mem. Soc. Cubana. Hist. Nat.*, 23 (1): 1-36.

10. YAMAGUTI, S.
1958. *Systema Helminthum.* I. (1-2). *The digenetic trematodes of vertebrates* XI + 1575 pp. Interscience Publishers, Inc. New York.

Fig. 1: Dibujo de una preparación total de *Ochetosoma bravoi* n. sp. Región ventral. (Holotipo).

Fig. 2: Dibujo de una preparación total de *Glypthelmins palmipedis* (Lutz, 1928) Travassos, 1930. Región dorsal.


0,5 mm
1
R.R.B.
0,5 mm
2
R.R.B.

He

U

el in
carmí
parac

cuerp
0,854
mm a
plares
0,64

---

* I
** I

Rev. Biol. Trop., 8(2):247-251, 1960

Helmintos de la República de Costa Rica XVIII. Una nueva especie de Euryhelmis (Trematoda: Heterophyidae), parásito de Mustela frenata costaricensis.

por

Rodrigo Ramón Brenes* y Guido Arroyo**

Otto Jiménez-Quirós*

(Recibido para su publicación el 30 de setiembre de 1960)

Familia.—HETEROPHYIDAE Odhner, 1914
Sub-familia.—Euryhelminae Morozov, 1950
Euryhelmis costaricensis n. sp.

Para la presente descripción se contó con seis ejemplares, encontrados en el intestino de una "comadreja" (*Mustela frenata costaricensis*) coloreados con carmín clorhídrico de Meyer y hematoxilina de Delafield y montados en preparaciones totales.

Tremátodos de forma generalmente cuadrangular, transparentes y de cuerpo escamoso que miden: 1,074 mm a 1,281 mm de largo por 0,716 mm a 0,854 mm de ancho. La ventosa oral es musculosa, subterminal y mide 0,073 mm a 0,080 mm de largo por 0,053 mm a 0,082 mm de ancho. Algunos ejemplares presentan una prefaringe muy corta; la faringe es subesférica y mide 0,64 mm de largo por 0,48 mm de ancho.

---

* Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
** Laboratorio de Investigaciones Médico-Veterinarias, Ministerio de Agricultura e Industrias, San José, Costa Rica.

El esófago es ligeramente largo, a veces sinuoso y mide 0,115 mm a 0,161 mm de largo por 0,011 mm a 0,013 mm de ancho.

Los ciegos intestinales se extienden tortuosamente, arqueados y siguiendo el contorno del cuerpo del parásito, hasta el extremo posterior y bordeando el nivel inferior testicular. El ciego derecho mide 1,014 mm de largo por 0,027 mm de ancho y el izquierdo 0,940 mm de largo por 0,032 mm de ancho. La ventosa ventral se localiza en posición preecuatorial y mide 0,096 mm a 0,101 mm de largo por 0,096 mm a 0,110 mm de ancho. La relación entre los diámetros de las dos ventosas es 1:1,31 × 1:1,37 a 1:1,34 × 1:1,81.

El gonotilo se sitúa anterior al acetábulo, rodeando al poro genital y mide 0,073 mm de largo por 0,052 mm de ancho.

Los dos testículos son grandes, en la misma zona, masiformes y lobulados, uno en frente del otro, muy cercanos entre sí, intracecales, situados en la región posterior, entre el nivel inferior del receptáculo seminal y la extremidad posterior de los ciegos intestinales. El testículo derecho es más voluminoso que el izquierdo, en sus diámetros anteroposterior y transversal, mide 0,277 mm de largo por 0,193 mm de ancho; y el izquierdo 0,230 mm de largo por 0,184 mm de ancho. La vesícula seminal es sacsiforme y mide 0,207 mm de largo por 0,080 mm de ancho.

El ovario es ovalado y se sitúa a la derecha entre el receptáculo seminal y las asas uterinas que lo bordean en ese mismo lado, mide 0,029 mm de largo por 0,230 mm de ancho.

Inmediatamente debajo del ovario se localiza el receptáculo seminal, muy voluminoso, más ancho que largo y mide 0,184 mm de largo por 0,298 mm de ancho. No se pudo observar la glándula de Mehlis ni el canal de Laurer. Las glándulas vitelinas están constituidas por numerosos folículos, en su mayoría extracecales, pero también existen cecales e intracecales; se extienden desde un nivel prebifurcal, bordeando a los dos ciegos intestinales, hasta el extremo posterior del parásito.

El útero, está constituido por numerosas asas que ocupan en su totalidad el área comprendida, entre el ecuador del parásito y limitada por el borde, inferior del ovario, a la derecha y a la izquierda de la línea media longitudinal, rodeando el borde interno de los ciegos, hasta la altura del gonotilo.

Los huevecillos son operculados y miden 0,029 mm de largo por 0,016 mm de ancho.

HUÉSPED: *Mustela frenata costaricensis*.

LOCALIZACIÓN: Intestino delgado.

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA: El Alto, Tres Ríos, Provincia de Cartago.

EJEMPLARES: En la colección de Helmintología del Laboratorio de Investigaciones Médico-Veterinarias con el Nº 50-45 y en la del Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica con el Nº 200-30.

DISCUSIÓN: El género *Euryhelmis* fue propuesto por Poche en 1926 y posteriormente enmendado por AMEEL (1) y por SENGER y MACY (2). YAMA-

GUTI (4), al tratar este género no cita las enmiendas anteriores, a pesar de que revisó para su publicación esos trabajos.

En esos mismos trabajos nos parece que algunas de las características señaladas para el género no se ajustan a las descripciones de las especies válidas lo cual es corroborado en el material por nosotros estudiado.

Así, AMEEL (1), apunta: *Eurybelmis* Rudolphi, 1819; ausencia de bolsa del cirro, vesícula seminal ausente, útero relativamente corto con tres vueltas, situado principalmente sobre el lado izquierdo del cuerpo, entre la ventosa ventral y la vesícula excretora. Sin gonotilo, según el mismo autor, aunque sin embargo en la descripción de su especie *E. monorchis* Ameel, 1938, sí lo señala.

SENGER y MACY (2), no mencionan la enmienda de Ameel y anotan lo siguiente: bolsa del cirro ausente, vesícula seminal presente o ausente, sin gonotilo conspicuo.

YAMAGUTI (4) escribe para el género lo siguiente: acetábulo pequeño, con testículos simétricos al final de los ciegos y cerca de la extremidad posterior y no hay gonotilo. Sin embargo tenemos que en *E. monorchis* Ameel, 1938, la ventosa oral mide 0,014 mm por 0,059 mm y el acetábulo 0,060 mm por 0,069 mm; que esta especie presenta un sólo testículo y que *E. monorchis*, *E. pacificus* y *E. pyriformis* tienen gonotilo.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto creemos muy oportuno en el presente trabajo dar una nueva diagnosis para *Eurybelmis* Poche, 1926.

HETEROPHYIDAE, EURYHELMINAE. Trematodos de menos de 2,5 mm. Cuerpo aplastado y generalmente más largo que ancho, espinoso. Ventosa oral terminal o subterminal, prefaringe muy corta, faringe corta, esófago pequeño, ciegos arqueados y terminando cerca de la extremidad posterior. Acetábulo relativamente grande, ecuatorial; uno o dos testículos, cerca de la extremidad posterior y al final de los ciegos; vesícula seminal presente; gonotilo delante de la ventosa ventral. Poro genital preacetabular. Ovario situado a la derecha y contiguo al receptáculo seminal. Receptáculo seminal generalmente voluminoso, postovariano y alargado transversalmente. Folículos vitelinos se extienden extracecal, cecal e intracecalmente, a lo largo de los ciegos intestinales. Utero con rama ascendente constituida por tres o más asas y localizado entre el testículo izquierdo y la ventosa ventral o en el espacio comprendido entre la zona media preecuatorial intracecal. Vesícula excretora en forma de T. Huevecillos operculados. Parásitos de mamíferos.

Hasta el presente se han descrito cuatro especies de este género: *E. squamula* (Rudolphi, 1819) Poche, 1926; *E. monorchis* Ameel, 1938; *E. pacificus* Senger *et* Macy, 1952; *E. pyriformis* Webster y Wolfgand, 1956 (3).

Por comparación de nuestro material con las figuras y descripciones de esas especies válidas, hemos observado diferencias muy notorias que a continuación anotamos:

Con *E. squamula* en forma y tamaño; posición, extensión y límites de asas uterinas; posición y forma de los testículos; posición y forma del ovario; forma, distribución y extensión de las vitelinas.

Con *E. monorchis* en forma y tamaño; forma y tamaño de ventosas; for-

ma y posición del ovario; distribución de las vitelinas; extensión y límite uterino y esencialmente por la presencia de un solo testículo.

Con *E. pacificus* tamaño de las ventosas; tamaño de la prefaringe; posición de la faringe, forma del ovario, forma y posición de las glándulas vitelinas; forma y tamaño del gonotilo.

Con *E. pyriformis* forma y tamaño del cuerpo; diferente tamaño de las ventosas; tamaño del esófago; forma y extensión de los ciegos; forma y posición del ovario; forma y tamaño del receptáculo seminal; forma y extensión uterina; forma y extensión de glándulas vitelinas y esencialmente por presentar un solo testículo.

En base a las consideraciones señaladas con anterioridad, consideramos que nuestros ejemplares pertenecen a una nueva especie *E. costaricensis*.

RESUMEN

Se hace una revisión del género *Eurybelmis* Poche, 1926, a la luz de las consideraciones hechas por los autores que han tratado del mismo.

Se propone una nueva diagnosis para el género incluyendo las enmiendas necesarias. Se describe una nueva especie: *E. costaricensis* encontrada en el intestino de *Mustela frenata costaricensis* ampliándose así la distribución geográfica para el género.

SUMMARY

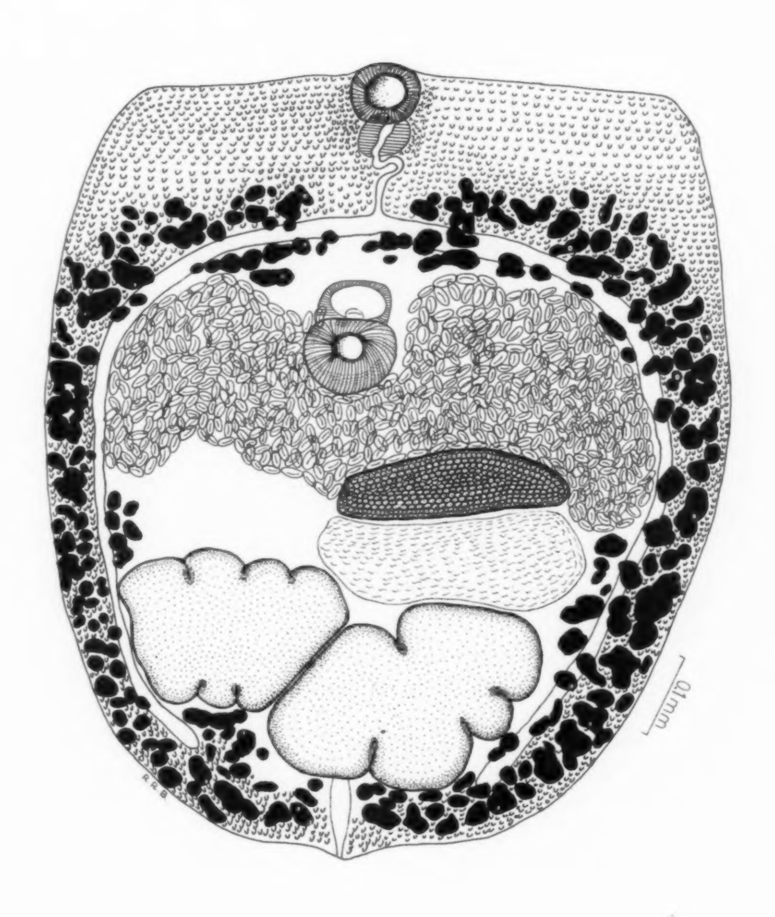
The genus *Eurybelmis* Poche, 1926 is revised and a new diagnosis propossed to amend the discrepancies found in the literature.

A new species, *E. costaricensis*, found in the intestine of a weassel (*Mustela frenata costaricensis*) is described, widenning the geographic distribution for the genus.

BIBLIOGRAFIA

1. AMEEL, D. J.
1938. The morphology and life cicle of *Eurybelmis monorchis* n. sp. (Trematoda) from the mink. *Jour. Parasit.*, 24 (3): 219.
2. SENGER, C. M. & R. W. MACY
1952. Helminths of Northwest mammals. Part III. The description of *Eurybelmis pacificus* sp. nov. and notes on its life cycle. *Jour. Parasit.*, 38 (5): 481-486.
3. WEBSTER, G. A. & R. M. WOLFGAND
1956. *Alaria canadensis* sp. nov. and *Eurybelmis pyriformis* sp. nov. from the skunk *Mephitis mephitis* in Quevec. *Canad. Jour. Zool.*, 34: 595-601.
4. YAMAGUTI, S.
1958. *Systema Helminthum. I. The digenetic trematodes of vertebrates* (1-2) xi + 1575 pp. Interscience Publishers, Inc. New York.

Fig. 1: Dibujo de una preparación total de *Eurybelmis costaricensis* n. sp. Región dorsal. (Holotipo).


0.1mm

Rev. Biol. Trop., 8(2):253-261, 1960

Entamoeba moshkovskii **Tshalaia, 1941 en Costa Rica**

por

Armando Ruiz*

(Recibido para su publicación el 30 de setiembre de 1960)

La *Entamoeba moshkovskii* es una entameba de quistes tetranucleados, perteneciendo por lo tanto al grupo "histolytica". Es la única especie conocida del género *Entamoeba* que no es parásita; sin embargo, desde el punto de vista morfológico es casi idéntica a la *E. histolytica.*

De una revisión de la literatura existente sobre el tema, se desprende que es muy posible que el primer investigador que observó a esta interesante ameba fuera LACKEY (7) en 1925, quien en un trabajo sobre la fauna de los tanques de digestión en las plantas purificadoras de aguas negras en New Jersey (Estados Unidos), menciona la presencia de pequeñas amebas lobulosas, sin vacuolas pulsátiles. En 1941 TSHALAIA (13) aisla una ameba del fango coleccionado de diversas partes de la planta purificadora de aguas negras de Moscú. La autora rusa incluye el rizópodo aislado en el género *Entamoeba* Casagrandi *et* Barbagallo y lo describe como *E. moshkovskii.* En 1942 WRIGHT y col. (16) notan en aguas negras de California una ameba que los autores consideran muy parecida a *E. histolytica.* Es muy probable que esta ameba fuera *E. moshkovskii.* TSHALAIA (14) en 1947 vuelve a aislar en cultivo la *E. moshkovskii* de la misma planta purificadora ya mencionada, además la aisla también de diversas partes de la red de cloacas de Moscú. La autora menciona también el aislamiento de la entameba a partir del material tomado de dos estanques así como también del material coleccionado de un río en Minsk. GNEZDILOV (5) en 1947 la encuentra en aguas negras de Leningrado. En 1949 AMARAL y AZZI-LEAL (1) examinan el lodo digerido tomado de un tanque de digestión de una planta purifi-

* Departamento de Parasitología, Universidad de Costa Rica.

cadora de aguas de albañal en São Paulo, Brasil, y observan trofozoitos y quistes de una ameba muy semejante a *E. histolytica*. Puestos los quistes en un medio apropiado previo tratamiento con ácido clorhídrico, dieron origen a trofozoitos indistinguibles de los de *E. histolytica*, diferenciándose de éstos por no requerir una determinada temperatura para crecer, puesto que crecen bien a temperatura ambiente. Los autores brasileños creen que la entameba aislada sea la *E. moshkovskii* descrita en Rusia por Tshalaia. En 1950 AZZI-LEAL y AMARAL (2) no consiguen infectar cobayos ni tampoco logran aislar la entameba de heces humanas. NEAL (9) en 1950 notifica la presencia de *E. moshkovskii* en aguas negras de Londres. En 1953 NEAL (10) publica un extenso estudio sobre la morfología y biología de cuatro cepas de *E. moshkovskii*. PIZZI (11) en 1956 observa que la *E. moshkovskii* fagocita glóbulos rojos de mamíferos, pero no de aves y la considera un parásito potencial de los primeros. En 1958, DE CARNERI (3) prueba la acción de 16 fármacos sobre la *E. moshkovskii* aislada en el Brasil y a la vez indica que no ha podido aislar el rizópodo en cuestión de aguas negras de la región de Milán. En el mismo año, DE CARNERI (4) no logra infectar hamsters ni ratas blancas con la cepa brisileña de *E. moshkovskii*, llegando a la conclusión de que es muy remota la probabilidad de que la ameba en estudio sea una fase de vida libre de un protozoario parásito. En 1958 ROGAVA (12) encuentra *E. moshkovskii* en canales de irrigación y estanques en Tashkent, Rusia. LACHANCE (8) en 1959 aisla una cepa de *E. moshkovskii* de aguas negras de Ste. Anne de Bellevue en la Provincia de Quebec, Canadá. En este mismo año, GOLDMAN (6) encuentra que la *E. moshkovskii* no reacciona con el suero anti-*E. histolytica* marcado con fluoresceína. El autor no menciona el origen de la cepa de *E. moshkovskii*.

A mediados de este año logramos aislar en Cartago, Costa Rica, algunas cepas de *E. moshkovskii*, cuya comunicación es el objeto de la presente nota.

MATERIAL Y METODOS

En Junio de este año se tomaron dos muestras del material contenido en los tanques de la planta purificadora de aguas negras de la Ciudad de Cartago. Las muestras se centrifugaron y el sedimento se observó a fresco y se cultivó en un medio difásico, usando como sustrato sólido suero humano coagulado y como sobrenadante un extracto de suero según la técnica de Westphal (15) para la preparación del medio de cultivo para *E. gingivalis*. Las entamebas aisladas se mantuvieron durante dos meses en dicho medio haciendo trasplantes cada semana, hasta que accidentalmente se perdieron.

En agosto de este año se tomaron de nuevo cuatro muestras del lugar ya indicado, lográndose aislar cinco cepas de *E. moshkovskii*, marcadas como CA-1, CA-2, CA-3, CA-4 y CA-5. Las entamebas se han mantenido hasta el

presente en el medio mencionado. Además, las hemos cultivado con sumo éxito en un medio elaborado por uno de nuestros asistentes* para el cultivo de *E. ranarum*. Este medio se prepara como sigue: a 200 ml de solución de Ringer diluida a la mitad con agua destilada desionizada se le agregan 20 gm de intestino posterior (cloaca) de sapo (*Bufo marinus*) fraccionado en pequeños trocitos, o en su defecto 20 gm de ciego de cerdo. El tejido se lava previamente en solución salina para eliminar las heces. Se hierve durante media hora y se filtra luego por algodón de manera que se obtenga un líquido claro y libre de partículas. Se completa el volumen de 200 ml con agua destilada desionizada. Se entuba en cantidades de 6 ml por tubo de ensayo y se esterilizan por tindalización tres veces consecutivas durante una hora, cada vez. Al momento de usarse se agrega un poquito de almidón de arroz estéril y 10 mg de dihidroestreptomicina. Los trasplantes los efectuamos cada 15 días. Las amebas se reproducen abundantemente en cuanto que la flora bacteriana es reducida en comparación de los otros medios empleados. Cuando el almidón desaparece las entamebas enquistan. El medio preparado con cualquiera de los dos tejidos ya mencionados da resultados idénticos.

Para el estudio morfológico de la *E. moshkovskii* se emplearon preparaciones teñidas. Es ya conocida la dificultad que existe en fijar el material de cultivos en cubreobjetos por los métodos usuales. Para este objeto hicimos uso de un fijador que hemos venido empleando con éxito en nuestro laboratorio para fijar material difícil de adherirse al cubre o portaobjetos. El fijador es el siguiente: a 100 ml de agua destilada se les agregan 5 gm de alcohol polivinílico. Se agita bien y se calienta a 70° C por algunos minutos hasta obtener una solución transparente u opalescente. Luego se agregan 100 ml de solución de bicloruro de mercurio alcohólica (2 partes de solución saturada de bicloruro de mercurio + 1 parte de alcohol de 95 por ciento). En un cubreobjetos desengrasado se pone una gota de sedimento que contiene las entamebas y luego se agrega una gota del fijador descrito. Se agita bien con un aplicador y luego se extiende formando una capa lo más delgada posible. Se deja secar durante 24 horas a temperatura ambiente y luego se procede de acuerdo con el método de Heidenhain para la tinción con hematoxilina férrica. Las fotografías que acompañan este trabajo están tomadas de preparaciones fijadas por el método descrito.

RESULTADOS

En las primeras muestras recogidas en los tanques de la planta purificadora de aguas negras de Cartago, se observó en el sedimento obtenido por centrifugación pequeñas y escasas amebas con las características de *E. moshkovskii*, junto con una serie más de mastigóforos y ciliados. Los cultivos mostraron amebas en regular cantidad a las 48 horas, siendo numerosísimas a los 8 días.

De las segundas muestras recogidas en el mismo sitio se aislaron cinco cepas con iguales características que las anteriores. De la cepa CA-3 son las fotografías que aparecen en este trabajo.

* Sr. Edwin Valenciano.

Los trofozoitos observados a fresco muestran un movimiento muy activo y direccional, debido a la emisión de un lobópodo siempre en el mismo punto seguido por una corriente constante de citoplasma. El núcleo no se observa en la entameba viva, salvo en raros casos. Tampoco pudimos observar vacuola pulsátil.

Los trofozoitos de la cepa CA-3 miden de 8 a 20μ en su mayor diámetro, con un promedio de 12,1μ. En preparaciones teñidas con hematoxilina de Heindenhain los trofozoitos muestran un núcleo vesiculoso, que mide de 1,4 a 4μ de diámetro, con una capa de cromatina periférica constituida por una serie de gránulos estrechamente dispuestos, dejando a veces algunos espacios claros, tal y como se aprecia en las figs. 1 a 8.

El cariosoma es pequeño y central, a veces ligeramente excéntrico. En el espacio intranuclear no se observó gránulo alguno. El citoplasma contiene bacterias en pequeñas vacuolas alimenticias o gránulos de almidón.

Cuando se agota el almidón de arroz agregado a los medios de cultivo la entameba enquista, dando quistes tetranucleados cuando maduros. Los quistes de nuestra cepa (CA-3) son pequeños, miden de 5,3 a 10,6μ de diámetro con un promedio de 8,0μ. Llama la atención la presencia de numerosos corpúsculos cromatoidales, aun desde la formación del quiste uninucleado; a veces son verdaderas masas como se puede apreciar en las figs. 11 y 12, que obscurecen los núcleos. Estos conservan las características del núcleo del trofozoito.

Nuestras cepas crecen tanto a 37°C como a temperatura ambiente, siendo ésta en la que se observa mayor desarrollo.

DISCUSION

El hallazgo de *E. moshkovskii* en Costa Rica amplía la distribución geográfica de esta curiosa entameba. La distribución geográfica pareciera ser universal, como se puede deducir de la revisión de la literatura existente *(vide supra)*.

Se ha pensado que la *E. moshkovskii* represente una fase de vida libre de alguna de las entamebas parásitas de quistes tetranucleados.

Por el hecho de encontrarse en cloacas y en los tanques de digestión de las plantas purificadoras se ha especulado que bien podría ser esta entameba la fase de vida libre de la *E. histolytica,* máxime que la entameba es capaz de fagocitar glóbulos rojos de mamíferos, inclusive los humanos (11); sin embargo, hasta el presente no se ha podido aportar evidencias para establecer la identidad de esta entameba con la *E. histolytica*. Por el contrario, las pocas investigaciones realizadas al respecto conducen a considerar a la *E. moshkovskii* como una buena especie. Así, el intento de implantar *E. moshkovskii* en diversos animales de laboratorio, algunos de ellos donde la *E. histolytica* evoluciona con facilidad, ha resultado infructuoso.

TSHALAIA (13) no logra infectar gatos con trofozoitos ni quistes de esta ameba. La inoculación intracecal en ratas blancas jóvenes ha dado resultados negativos (4, 10). DE CARNERI (4), basándose en el hecho de que cepas de *E.*

histolytica de difícil implantación en el ciego de ratas adquieren mayor infectividad y aún virulenta cuando se les inocula previamente en hígado de hamster, inyecta estos animales intrahepáticamente con *E. moshkovskii* obteniendo resultados negativos, puesto que la ameba no sobrevive más de tres o cuatro días en este habitat. Tampoco se ha podido obtener infecciones en cobayos (2). Nosotros hemos hecho numerosas tentativas de obtener *E. moshkovskii* directamente de heces humanas, cultivando éstas en las condiciones apropiadas y siempre hemos obtenido resultados negativos, hecho ya indicado por AZZI-LEAL y AMARAL (2) en Brasil. Desde el punto de vista serológico se aparta la *E. moshkovskii* de la *E. histolytica*, puesto que GOLDMAN (6) obtiene resultados negativos al poner trofozoitos de *E. moshkovskii* en presencia de suero anti-*E. histolytica* marcado con fluoresceína. Todo esto nos conduce a pensar en la remota posibilidad de que la *E. moshkovskii* sea una fase de vida libre de *E. histolytica*.

La *E. moshkovskii* se ha aislado también de estanques (12, 14), ríos (14) y canales de irrigación (12), suceso que ha permitido pensar en la posibilidad de que esta entameba constituya una fase de vida libre de *E. ranarum*. TSHALAIA (14) trató de infectar renacuajos de rana (no se indica la especie) sin ningún éxito. NEAL (10) tampoco consigue infectar renacuajos de *Rana temporaria* ni larvas de *Salamandra maculosa*. Pareciera entonces que la *E. moshkovskii* no tiene nada que ver con la *E. ranarum*.

Concluyendo, podemos decir que la *E. moshkovskii* pareciera no corresponder a ninguna fase evolutiva de las entamebas parásitas y que debemos considerarla como una buena especie.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer aquí al Sr. José Rafael Brenes por las tomas de las muestras.

RESUMEN

Se menciona el hallazgo de *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941 en los tanques de digestión de la planta purificadora de aguas de albañal de la Ciudad de Cartago, Costa Rica.

Se describen los medios de cultivo empleados y la técnica de fijación usada para la observación de preparaciones teñidas.

Se hace una breve descripción de la cepa costarricense de *E. moshkovskii*, acompañándola de algunas fotomicrografías.

El autor considera a la *E. moshkovskii* como una buena especie y no cree que se trate de una fase de vida libre de alguna de las entamebas parásitas de quistes tetranucleados.

SUMMARY

The finding of *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941 in the sewage digestion tanks of the City of Cartago, Costa Rica is mentioned.

A description of the culture media and the fixation technique employed in the observation of stained preparations is given.

A brief description of the strain of *E. moshkovskii* isolated in Costa Rica, together with some photomicrographs, is presented by the author.

E. moshkovskii is considered as a good species by the author, not believing that this is a case of a free-living phase of some parasitic entamoeba with tetranucleate cysts.

BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, A. D. & R. AZZI-LEAL
1949. Sôbre uma *Entamoeba* semelhante a *E. histolytica* encontrada em material de esgoto. *Rev. Paulista Med.*, 34:173-176.

2. AZZI-LEAL, R. & A. D. AMARAL
1950. Novos estudos sôbre amebas encontradas em esgoto con referencia especial a uma endamoeba (*E. moshkovskii*) semelhante a *Endamoeba histolytica*. *Arq. Fac. Hig. Saude Publ. Univ. S. Paulo*, 4: 125-134.

3. CARNERI, I. DE
1958. Studi su *Entamoeba moshkovskii*. I. Velocitá d'azione di 16 farmaci sui trofozoiti di *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941 a 3 diverse temperature. *Riv. Parasit.*, 19:81-89.

4. CARNERI, I. DE
1958. Studi su *Entamoeba moshkovskii*. II. *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941, come potenziale parassita: sua sopravvivenza nelle infezioni sperimentali intraepatiche dell'hamster e indociecali del ratto albino. *Riv. Parasit.*, 19: 161-168.

5. GNEZDILOV, V. G.
1947. La distribución geográfica, epidemiología y profilaxis de la amibiasis (en ruso). *Med. Parazitol. Parasitar. Bolezni*, 16: 13-32.

6. GOLDMAN, M.
1959. Microfluorimetric evidence of antigenic difference between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba hartmanni*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102: 189-191.

7. LACKEY, J. B.
1925. Studies on the biology of sewage disposal. The fauna of Imhoff tanks. *Bull. N. J. Agric. Exp. Sta.*, N° 417, 39 pp.

8. LACHANCE, P. J.
1959. A canadian strain of *Entamoeba moshkovskii* Chalaia, 1941. *Can. J. Zool.*, 37: 415-417.

9. NEAL, R. A.
1950. A species of *Entamoeba* from sewage. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 44: 9.

10. NEAL, R. A.
1953. Studies on the morphology and biology of *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941. *Parasitology*, 43: 253-268.

11. PIZZI, T.
1956. Observaciones sobre fagocitosis de eritrocitos por *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941. *Bol. Chileno Parasit.*, 11: 7-9.

12. ROGAVA, L. I.
1958. Sobre *Entamoeba moshkovskii* (en ruso). *Med. Parazitol. Parazitar. Bolezni*, 27: 330-334.

13. TSHALAIA, L. E.
1941. Sobre una especie de *Entamoeba* hallada en aguas de albañal (en ruso). *Med. Parazitol. Parazitar. Bolezni*, 10: 224-252.

14. TSHALAIA, L. E.
1947. Contribución al estudio de *Entamoeba moshkovskii* (en ruso). *Med. Parazitol. Parazitar. Bolezni*, 16: 66-69.

15. WESTPHAL, A.
1941. Ein Kulturverfahren für *Entamoeba gingivalis* und dessen Anwendung für die Differentialdiagnose von *E. gingivalis* und *E. histolytica*. *Dtsch. tropenmed. Ztschr.* 45: 685.

16. WRIGHT, W. H., E. B. CRAM & M. O. NOLAN
1942. Preliminary observations on the effect of sewage treatment processes on the ova and cysts of intestinal parasites. *Sewage Works*, 14: 1274-1280.

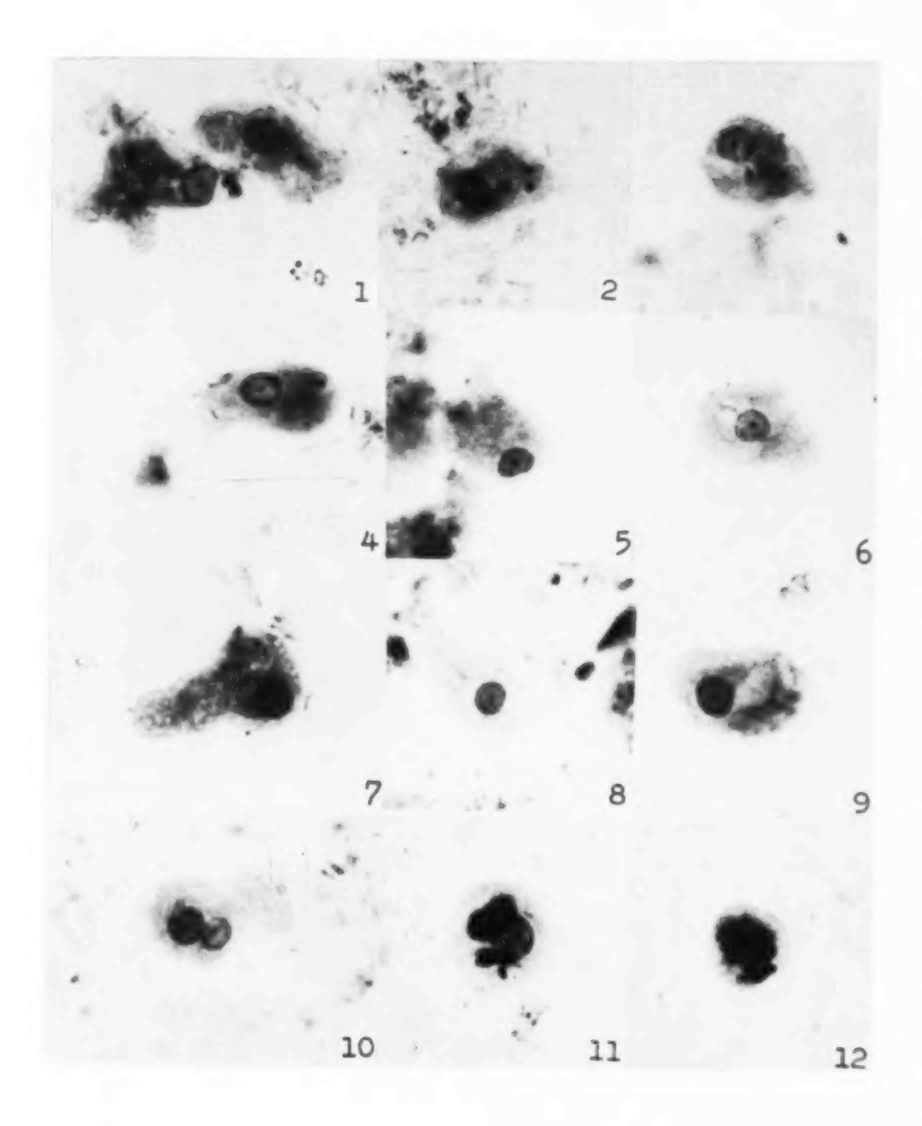
Fig. 1 a 12: *Entamoeba moshkovskii*. Col. hematoxilina férrica de Heidenhain. ca. 1800 ×.

Fig. 1 a 9: Diversas formas de trofozoitos.

Fig. 10: Trofozoito binucleado.

Fig. 11: Quiste uninucleado.

Fig. 12: Quiste con numerosos corpúsculos cromatoidales que cubren a los núcleos.


1
2
4
5
6
7
8
9
10
11
12

the
ve
org
wh
fac
cu
tu
Fu
ha
ci
pu

gr
sp
of

an
us
na
Se
as

---

*

**

1

Rev. Biol. Trop., 8(2):263-269, 1960

A simple method for obtaining protozoa in pure culture *

by

Austin Phelps and Bernal Fernández **

(Received for publication September 30, 1960)

It is now generally recognized that most types of physiological work on the protozoa are greatly restricted in their scope unless the organism under investigation can be raised in pure culture, that is, in the absence of any other organisms. This is particularly true in the field of biochemical investigations, where the presence of other living organisms usually vitiate the results. This fact has led many investigators to try to obtain new species of protozoa in pure culture. Of those which have unquestionably been made to grow in pure culture, between three and seven species[1] of Ciliates, hace belonged to what FURGASON (4) has called the "*Glaucoma-Colpidium* group", and Corliss (2, 3) has called the "*Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group". *Paramecium* is the only Ciliate not belonging to this group that has been achieved in pure culture (6, 11).

It is possible that many other of the common Ciliates may be made to grow in pure culture, but the amount of effort required to isolate all of the species found in a given sample taken from nature makes the determination of their potentiality impractical by conventional methods.

Different degrees of success have been attributed to methods employing antibiotics for obtaining protozoa in pure culture. ADLER and PULVERTAFT (1) used penicillin to help to purify a culture of the Flagellate parasite *Trichomonas vaginalis*. Subsequently the use of penicillin was extended to Ciliates by SEAMAN (10). PHELPS (9) described briefly a method for using streptomycin as an aid in purifying protozoa obtained from nature.

---

* This work was made possible by funds from The Research Institute of The University of Texas, and was carried out at the Department of Zoology, The University of Texas, Austin, Texas.

** Present address: Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

1 The precise number of species in this group which have been obtained in pure culture is questionable since taxonomists are currently at variance on this point.

The objetive of the present work was to develop a simple and effective method for discovering and isolating in pure culture all of the Ciliates in a water sample which can be made to grow in a particular nutrient medium.

MATERIALS AND METHODS

The method which has been developed for archieving this objetive consists of two parts: a) the enrichment of a water sample with a nutrient material to which has been added antibiotics to inhibit or delay the growth of most contaminants; b) the final purification of the culture by permitting the protozoa in the sample to swim through a migration tube.

a) We have tested the following antibiotic drugs in varying concentrations and combinations: penicillin, streptomycin, chloramphenicol (chloromycetin), terramycin, aureomycin, bacitracin, tyrothricin, and several of the sulfa drugs which were added to the natural water sample together with Bacto-Proteose Peptone (0.5 per cent). It was found that the most effective combination to inhibit growth of the bacterial flora, and still permit growth of protozoa consisted of approximately 0.5 mg/ml of streptomycin and 0.1 mg/ml of sulfathiazole. This combination has been observed to permit growth of the commonly ocurring Ciliates in contaminated cultures and in no way does it inhibit the rapid growth of members of the "*Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group" in pure culture. Bacterial growth is arrested in water samples exposed to this treatment in about half of the cases. Various concentrations of "Moldex" (Turtox) and of trichothecin have been tried in an attempt to inhibit the growth of molds, but without success; we have found that concentrations just sufficient to discourage molds are also toxic to protozoa. This preliminary treatment of the samples does not render the protozoa strictly bacteria-free but allows them to grow into visible populations so that a simple inspection will determine which samples may contain forms capable of surviving in pure culture and which should be rejected at this point. In general, good returns have been obtained by collecting between five and ten 10-ml samples from a given source.

(b) Since protozoa which have been subjected to the above treatment are rarely entirely free of contaminants, they are next subjected to treatment in a migration tube designed to effect complete purification. Migration tubes, which depend for their effectiveness on the principle that actively motile protozoa swim much more rapidly than their accompanying contaminants, and hence ultimately leave them behind, have been in occasional use. Most of them, however, have been so complicated or cumbersome as to limit their general use. The migration system which we have designed is shown in Figure 1, and consists of a piece of glass tubing about 120 cm long, 6 mm OD, and 4 mm ID, bent into a series of vertical convolusions. To one end of this tube a shortstemmed thistle tube is attached by means of a short piece of rubber tubing; the other end is attached by rubber tubing to a U-shaped piece of glass tubing, each arm being about 12 cm long. One arm of the U-tube passes through a two-

hole rubber stopper to the bottom of a 125 ml Erlenmeyer flask. A short bent piece of glass tubing is inserted in the other hole of the stopper and is plugged with cotton to maintain sterility in the flask. About 90 ml of medium, consisting of 0.5 per cent proteose peptone in tap water, is placed in the Erlenmeyer flask, a clamp is placed on the rubber tube to prevent the medium from flowing through the migration tube during autoclaving, and the mouth of the thistle tube is plugged with cotton. The neck of the Erlenmeyer flask and its rubber stopper are wrapped in cotton. The migration system mounted to a support-stand by two clamps and cushioned with a two-hole rubber stopper cut in halves in then autoclaved. If the system is to be used soon after autoclaving, the flask is shaken thoroughly to aerate the medium. The clamp is removed from the rubber tube and air is blown through the piece of glass tubing provided with sterile cotton in order to fill the system with medium. If bubbles of air remain in the system, they must be removed by sucking the medium back into the flask, and again forcing it through the glass tubing until the fluid in the cup and that in the flask are at the same level. A pinch clamp is applied to the rubber tubing and about 2 ml of medium is withdrawn from the thistle tube, 0.5 ml of the culture to be purified is added and the pinch clamp is removed from the rubber tube. This procedure insures against gravity flow of the contaminants in the direction of the flask. The set-up should not be disturbed until a visible population of protozoa is observed in the Erlenmeyer flask. In our experience, cultures usually go through the tube and form a population in the Erlenmeyer flask in about three days, but a few strains have taken as long as a week. After a population is observed in the flask, the pinch clamp is reapplied to the rubber tube, and the flask, U-tube, and rubber tube are removed from the rest of the system. The cotton wrapping the neck of the flask is removed, the flask is unstoppered, and samples are transferred to sterile media.

RESULTS

We have used the migration tube for the last ten years with an efficiency of between 90 and 95 per cent. Thirteen new strains of *Tetrahymena pyriformis* have been obtained by using the methods described in this paper. The origin of five of these, EZ, HS, LR, N, and Y, has been described (2). In addition, we have obtained BF and CR from San José, Costa Rica; AB from Abilene, Texas; PE from Ft. Stockton, N.M.; LA from Grants, N.M.; TC from Truth or Consequences, N.M.; and PR from Lake Florida, near San Juan, Puerto Rico.

Marked strain differences appeared within the species. Thus, strains TC, Y, and HS are thermophilic and grow at a temperature as high as 40.5°C, whereas ordinary strains of *T. pyriformis* will not grow at temperatures above 32° C. Strain N is partially thermophilic and will grow at a temperature as high as 37° C. Strains AB, LA, and PE produce a dark brown water soluble pigment during the first few months of growth in the laboratory but subse-

quently lose this potentiality. Biochemical differences have been observed among these stocks, the details of which are beyond the scope of this paper.

For routine purification of contaminated laboratory stock cultures it is not necessary to treat the culture of protozoa with antibiotics prior to putting it through the migration apparatus; nor is this pretreatment absolutely essential in attempting their original isolation from natural waters. Nevertheless it must be emphasized that in the latter case this step is quite useful in enhancing the likelihood of obtaining new forms from nature capable of growing in pure culture.

DISCUSSION

The conventional methods used to isolate protozoa in pure culture have depended upon the isolation of a single cell (5, 7, 8). In addition to being time consuming, this method permits the operator to wash only a few individual protozoan cells at a time. The method which has just been described requires little time and effort, and should afford an opportunity to isolate all protozoa present in a sample of natural water which are capable of living in pure culture in proteose peptone or other media. Actively motile protozoa will tend to swim throuh such a medium by random movement at a rate which exceeds by far the motility of accompanying bacteria; and if the protozoa can live and reproduce, they should migrate through the system sufficiently fast to leave all the bacteria behind unless their progress is blocked by some tropism. Their forward motion through the migration tube is probably encouraged by the fact that their environment at the starting point of the migration apparatus becomes unfavorable due to the exhaustion of oxygen and to the accumulation of excretory products.

It is particularly noteworthy that in every sample obtained from nature which yielded protozoa capable of living in axenic culture on proteose peptone, no protozoa were found other than those belonging to the "*C-G-L-T* group", and in every case these protozoa appeared to be *Tetrahymena*. It is very likely that using the appropiate medium other Ciliates may be obtained in pure culture employing the method just described.

SUMMARY

1. A simple and effective method is described for discovering and isolating in pure culture all of the Ciliates in a sample of natural water which can be made to grow axenically in a particular medium, making use of a combination of antibiotics and a migration system.

2. Construction and operation details of the migration apparatus are given.

3. Using proteose peptone as the growth medium, only members of the genus *Tetrahymena* were obtained from natural waters.

RESUMEN

1. Se describe un método sencillo y efectivo, en el que se emplea una combinación de antibióticos y un aparato de migración, para descubrir y aislar en cultivo puro todos aquellos ciliados presentes en una muestra de agua natural que sean capaces de crecer axénicamente en un medio dado.

2. Se dan los detalles para construir y operar el aparato de migración.

3. Empleando proteosa peptona como medio de cultivo, sólo se obtuvieron miembros del género *Tetrahymena* a partir de muestras de aguas naturales.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Man beschreibt ein erfolgreiches und einfaches Vorgehen zur Isolierung in reine Kultur der in einer Süsswasserprobe vorhandenen Wiempertiere, die befähigt sind, auf einer bestimmten Nährlösung bakterienfrei zu gedeihen. Das Verfahren besteht aus einem Wanderungssystem und Anwendung von antibiotischen Mitteln.

2. Es wird die Anweisung zur Herstellung und Handhabung des Wanderungsapparates gegeben.

3. Bei Anwendung von Proteose-Peptone-Lösung als Nährboden, wurden bisher nur Vertretter der Gattung *Tetrahymena* aus Proben verschiedener Süsswassersammlungen isoliert.

REFERENCES

1. ADLER, S. and J. V. PULVERTAFT
1944. The use of penicillin for obtaining bacteria-free cultures of *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 38: 188-189.

2. CORLISS, J. O.
1952. Comparative studies on holotrichous ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group. I. General considerations and history of strains in pure culture. *Trans. Amer. Microscop. Soc.*, 71: 159-184.

3. CORLISS, J. O.
1953. Comparative studies on holotrichous ciliates in the *Colpidium-Glaucoma-Leucophrys-Tetrahymena* group. II. Morphology, life cycles, and systematic status of strains in pure culture. *Parasitology*, 43: 49-87.

4. FURGASON, W. H.
1940. The significant cytostomal pattern of the "*Glaucoma-Colpidium* group", and a proposed new genus and species, *Tetrahymena geleii*. *Arch. Protistenk.*, 94: 224-266.

5. HARGITT, G. T. and W. W. FRAY
1917. The growth of *Paramecium* in pure cultures of bacteria. *J. Exp. Zool.*, 22: 421.

6. JOHNSON, W. H. and E. G. S. BAKER
1942. The sterile culture of *Paramecium multimicronucleata*. *Science*, 95: 333-334.

7. KIDDER, G. W., D. M. LILLY and C. L. CLAFF
1940. Growth studies on ciliates: IV. The influence of food on the structure and growth of *Glaucoma vorax*, sp. nov. *Biol. Bull.*, 78: 9-23.

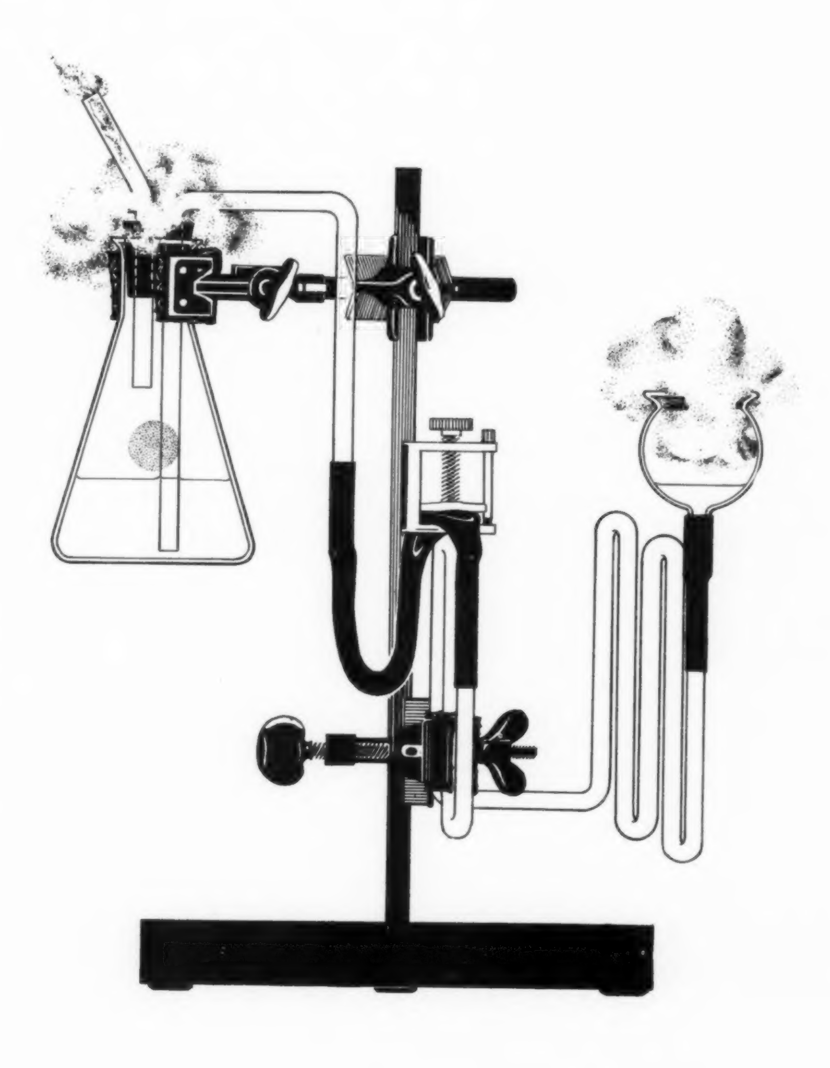
8. PARPART, A. K.
1928. The bacteriological sterilization of *Paramecium*. *Biol. Bull.*, 55: 113-120.

9. PHELPS, A.
1947. A method for isolating from natural water those protozoa which can live in pure culture. *Anat. Rec.* 99: 609.

10. SEAMAN, G. R.
1947. Penicillin as an agent for sterilization of Protozoan cultures. *Science*, 106: 327.

11. WAGTENDONK, W. J. VAN and P. L. HACKETT
1949. The culture of *Paramecium aurelia* in the absence of other living organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 35: 155-159.

Fig. 1: Diagram of migration apparatus (explanation in text).



Rev. Biol. Trop., 8(2):271-278, 1960

Manifestaciones alérgicas en oftalmología. 1. Retinitis alérgica a infección focal estafilocóccica: su importancia diagnóstica y tratamiento exclusivo con autoalérgenos*

por

Otto Jiménez-Quirós**

Pedro L. Vieto A.***

Rodrigo Saborío E.****

y

Alexis Agüero S.****

(Recibido para su publicación el 30 de setiembre de 1960)

Con este trabajo damos comienzo a una serie de estudios sobre manifestaciones alérgicas en oftalmología. Trataremos al presente el problema de las retinitis, ya que éstas preocupan por igual tanto al paciente como al médico cuando, una vez investigadas las causas consideradas clásicas, no se logra obtener regresión de los fenómenos patológicos ni estabilizar el cuadro en una fase compatible con un grado satisfactorio de visión, y se asiste, sin recursos, a la imprevisible repetición de recaídas.

En los últimos dos años pudimos observar, entre las formas consideradas alérgicas y rebeldes a los tratamientos actuales, dos casos clínicos que, por haber sido sospechados como consecuentes a infección focal, fueron investigados en tal sentido, y una vez que el diagnóstico se confirmó, tratados con éxito. Una nota previa, de estos casos, ha sido ya publicada (20).

---

* Trabajo presentado al 8° Congreso Médico Centroamericano de Panamá, Diciembre de 1959.

** Sección de Salud y Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

*** Laboratorio Clínico de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

**** Servicio de Oftalmología del Hospital San Juan de Dios.

CASOS CLINICOS

CASO Nº 1. A. C. B., hombre de 39 años de edad, robusto, instructor deportivo, de costumbres sanas.

Al examen médico general encontramos: piel y mucosas visibles aparentemente sanas y que reflejan buen estado de salud y hematopoyesis; oídos, mucosa nasal, faringe, laringe y cuello sin datos patológicos; ligera desviación del *septum*. Dentadura casi completa y en buen estado de higiene. Tiroides normal. Tórax y corazón normales. Normocárdico, normotenso (120/70). Abdomen tratable, línea alba íntegra, colon tratable en su totalidad, hígado y bazo a la palpación y percusión dentro de límites normales. Riñones no se palpan, genitales normales, próstata de tamaño y consistencia normal. En axilas, ingles y pies ninguna evidencia de infección dermatofítica ni bacteriana. Reflejos pupilares, cremastéricos y patelares normales.

En anamnesis remota anotamos: comunes enfermedades exantemáticas de la infancia, parotiditis epidémica y frecuentes afecciones catarrales de vías aéreas superiores. A los 20 años uretritis blenorrágica, curada. Manifestaciones alérgicas pasajeras (prurito, urticaria, rinitis). Además: manifestaciones alérgicas familiares (urticaria, jaqueca, rinitis).

En anamnesis reciente, después de rinosinusitis y ya clínicamente curado, aparición sub-intrante de trastornos visuales que motivaron consulta con oftalmólogo. En virtud del examen de fondo de ojo se formuló el diagnóstico de corioretinitis izquierda y recibió tratamiento con antibióticos, corticosteroides, vitaminas y medicamentos tópicos. En esa ocasión y luego en una clínica de los Estados Unidos, se le practicaron exámenes de laboratorio (heces, orina, hemograma, velocidad de eritrosedimentación, dosaje de urea y glucosa sanguíneas, intradermorreacciones a la tuberculina, toxoplasmina e histoplasmina) y además: radiografías de arcadas dentales, sinus paranasales y campos pulmonares. Todas las investigaciones resultaron normales, a no ser una discreta leucocitosis (12.500 leucocitos por mm^3) con eosinofilia relativa (7%).

Cuando el caso fue visto por nosotros la enfermedad databa ya de seis meses, sin ninguna tendencia regresiva. La consideramos de origen alérgico a infección focal no bien investigada todavía. Realizamos nuevos exámenes de laboratorio y, entre éstos, una intradermorreacción con alergeno de estafilococos. Esta prueba nos dió reacción muy positiva inmediata y no obstante que al examen clínico la mucosa nasal y las amígdalas estaban en perfectas condiciones, de las fosas nasales se aislaron dos cepas de cocos Gram positivos hemolíticos con características bioquímicas y morfológicas correspondientes a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus*.

El antibiograma demostró apenas ligera sensibilidad hacia Eritromicina y Penicilina.

Se preparó entonces un autoalergeno que reunía ambas cepas en la concentración de 3.000 millones de gérmenes por ml, y con una dilución de éste de 1/5.000 se practicó una prueba intradérmica, obteniéndose reacción inmediata positiva (+++) y pocos minutos después disturbios oculares, de breve duración, en el ojo enfermo.

Dicha prueba y los disturbios visuales nos llevaron a formular el diagnóstico de sensibilidad retiniana a las cepas aisladas. Con este concepto, iniciamos desde el día siguiente tratamiento exclusivo con el autoalergeno, con la doble finalidad de erradicar el foco nasal y desensibilizar la retina, que consideramos órgano de choque.

Para iniciar el tratamiento usamos la dilución 1/50.000, suministrando dos inyecciones diarias durante las dos primeras semanas, una diaria durante las dos semanas sucesivas, luego una cada dos días, cada tres, hasta llegar, al cabo de dos meses de iniciar esta terapia, a una dosis semanal de mantenimiento con 0,2 ml de la concentración original. Aumentamos las dosis parciales en 0,1 ml cada vez, hasta llegar a lo que con-

sideramos la dosis de mantenimiento, y prolongamos este régimen por espacio de dos meses.

A los veinte días de iniciado nuestro tratamiento el examen de fondo de ojo revelaba ya una mejoría del cincuenta por ciento, y al finalizar el segundo mes una *restitutio ad integrum* de las lesiones retinianas preexistentes de más del ochenta por ciento.

Después de cuatro meses de visión prácticamente normal el paciente presentó una leve recaída y ésta coincidió con el aparecimiento de síntomas uretrales. En los frotes y cultivos de secreción uretral y mucosa nasal se logró aislar, de ambas partes, cepas de cocos Gram positivos, hemolíticos, que correspondieron bioquímica y morfológicamente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus*, idénticas a las de los cultivos anteriores. Con las cepas de origen uretral se preparó otro autoalergeno para iniciar nuevo tratamiento.

Esta vez usamos dosis más altas y aumentamos a 0,2 ml la dosis diaria. La uretritis cedió en el término de dos semanas (comprobada con nuevos cultivos) y los síntomas retinianos (edema, cuerpos extraños) tuvieron rápida resolución al cabo de tres semanas. El tratamiento de mantenimiento lo prolongamos por espacio de tres meses, con una dosis semanal de 0,5 ml de la solución original (3.000 millones de gérmenes por ml).

Al presente nuestro paciente lleva más de un año de gozar perfectas condiciones oftálmicas, con un noventa por ciento de visión en el ojo primitivamente afectado.

CASO N° 2. O. Z. Z., mujer de 30 años de edad. Natural de Líbano y residente en Nicaragua. Al examen médico general encontramos: piel y mucosas visibles demuestran buen estado de salud y hematopoyesis; oídos normales, faringe con hipertrofia del anillo de Waldeyer, amigdalectomizada, laringe normal, mucosa nasal con lado derecho normal pero el izquierdo con ligera hipertrofia de cornetes y edema cianótico, desviación del *septum* hacia la izquierda. Faltan algunas piezas dentales y existen obturaciones con oro. Higiene bucal bien conservada, lengua geográfica. Cuello normal con tiroides y linfoglándulas cervicales dentro de límites normales. Tórax y corazón normales, normocárdica, normotensa (120/70). Abdomen tratable, sin datos patológicos, hígado y bazo no se palpan y están en sus límites a la percusión; línea alba íntegra. Extremidades normales, y en axilas, ingles y pies, no hay evidencias de infección fungosa ni microbiana. Aparato genital no se exploró. A la diafanoscopía de sinus: opacidad completa del frontal derecho y disminución luminosa del maxilar del mismo lado.

En anamnesis remota encontramos: enfermedades exantemáticas de la infancia, frecuente rinitis de tipo alérgico, secundarias a infecciones respiratorias altas, recurrentes; frecuentes cefaleas y urticaria. Cinco partos normales. Hace tres años, cervicitis erosiva resistente a tratamientos (antibióticos tópicos e inyectados); se aisló entonces flora patógena y, entre los gérmenes, un estafilococo no definido. La ulceración fue electrocoagulada, sanando. Alergia familiar presente (rinitis, urticaria, asma).

La enfermedad actual se inició hace cuatro años ,después de una sinusitis maxilar derecha; el oftalmólogo que en aquel entonces examinó a la paciente hizo el diagnóstico de corioretinitis izquierda, de etiología incierta y prescribió diversos tratamientos a base de antibióticos, antihistamínicos, corticosteroides, vitaminas, obteniéndose tan sólo mejorías transitorias. Sin embargo, la más evidente de esas correspondió a la electrocoagulación de la cervicitis, después de un período inicial en que se exacerbaron los disturbios oculares.

Al ser vista la paciente por nosotros, formulamos el diagnóstico de corioretinitis alérgica debida a infección focal no bien investigada.

El recuento leucocitario y diferencial nos ofreció un dato digno de ser tomado en cuenta: leucocitosis (11.400 leucocitos por mm^3 con eosinofilia relativa (10%). Las radiografías demostraron: atresia del sinus frontal derecho, opacidad correspondiente a hipertrofia de mucosa y sinusitis crónica maxilar derecha, desviación del *septum*. Campos pulmonares despejados. Ningún indicio de foco dental. Entre las varias pruebas

intradérmicas que practicamos, la de alergeno de estafilococos dió reacción positiva inmediata (+++).

Hicimos entonces lavado del sinus enfermo y realizamos cultivos. Se aisló una cepa de cocos Gram positivos, hemolíticos y que bioquímica y morfológicamente correspondió a *Staphylococcus aureus*.

El antibiograma demostró resistencia a todos los antibióticos y sulfas, exceptuando una débil sensibilidad hacia Eritromicina.

Se preparó entonces un autoalergeno con una suspensión de 3.000 millones de gérmenes por ml, y con una dilución de 1/5.000 se practicó una prueba intradérmica que dió reacción inmediata positiva (++++) y aparición de disturbios transitorios en el ojo.

Iniciamos de inmediato el tratamiento con la dilución 1/50.000, de la siguiente manera: dos inyecciones diarias durante las dos primeras semanas, aumentando a 0,2 ml cada vez y pasando a diluciones más concentradas. Pero, como la señora debía regresar al país de residencia, después de practicar un control de fondo de ojo en que las lesiones fueron evaluadas en un treinta por ciento menos, dimos indicaciones precisas de como continuar el tratamiento allá, y de regresar cuatro meses después para exámenes generales de control.

Los controles se practicaron en el tiempo previsto. La sinusitis había desaparecido y la radiografía demostró únicamente ligera hipertrofia mucosa, sin signos inflamatorios, atresia de sinus frontal derecho y desviación de *septum*. El examen de fondo de ojo mostró noventa y cinco por ciento de *restitutio ad integrum* de las lesiones retinianas preexistentes. Probada también la sensibilidad cutánea con alergeno de estafilococos obtuvimos prueba positiva inmediata (+).

Han transcurrido ya diez meses desde el último control, y por noticias recibidas sabemos que la paciente ha continuado en perfectas condiciones oculares y rinosinusales.

DISCUSION

En base a los trabajos de NICOLLE y ABT (22), COCA (7), BEDELL (2), BOTHMAN (4), PLUMER (24), PREWITT (25), BALYEAT (1), PARDEE (23), HANSEN (18), SENEAR (26), BRUNSTING (5), VELZEBOER (27) y CORTÉS (10) no puede ponerse en duda que los diversos tejidos oculares y entre éstos la retina, puedan ser órganos de choque frente a los más variados alergenos. Y, de acuerdo con observaciones clínicas y estudios experimentales de URBACH (28), COOKE (9), D'ERMO Y SALVI (11), GORDILLO-HERNANDEZ (17), JIMÉNEZ-QUIRÓS y cols. (19), GOLDMAN (16), KHAN y cols. (21), DWORETZKY y cols. (12, 13, 14, 15), BEISER (3) y COHEN y cols. (8), tampoco puede negarse que los estafilococos sean agentes capaces de sensibilizar los más diversos tejidos y entre éstos, la retina, aunque nunca se haya mencionado.

En nuestros casos clínicos todos los enunciados de CORTÉS (10) para alergia ocular estaban presentes.

Nuestro criterio se fundamentó además en la sensibilidad cutánea demostrada en nuestros casos, ya fuera a un alergeno estafilocóccico comercial o al autoalergeno preparado por nosotros, y la comprobación de que la retina era órgano de choque, ya que la inyección subcutánea del autoalergeno produjo disturbios oculares transitorios.

El caso Nº 1 presentó un aspecto interesante. Una vez que se obtuvo mejoría clínica y *restitutio ad integrum* de la casi totalidad de las lesiones retinianas, la uretritis concomitante fue responsable de la recaída ocular, pero el

antígeno obtenido de la cepa uretral curó, tanto la uretritis como las manifestaciones de la retina.

El caso Nº 2, en la anamnesis, nos hizo considerar un hecho parecido, porque la relativa mejoría de los trastornos oculares correspondió a la electrocoagulación de la cervicitis erosiva, causada ésta entre otros gérmenes, por un tipo de estafilococo resistente a los antibióticos; dicha mejoría clínica fue más duradera que la obtenida por tratamientos médicos en el transcurso de un largo período de sensibilización y choque alérgico retiniano.

Si bien el concepto clásico de infección focal admite una causa macroscópicamente evidenciable (sinusitis, amigdalitis, granuloma apical, uretritis, cervicitis, etc.), nosotros hemos tenido otro punto de vista al considerar que gérmenes de gran ubicuidad como los estafilococos, pueden aislarse aún de mucosas aparentemente sanas. En nuestro caso Nº 1 su microbismo latente no daba manifestaciones *in loco* pero sí producía alergenos sensibilizantes de la retina. De otra parte, el microbismo latente de fosas nasales (causa focal frecuente para mantener bronquitis asmáticas) lo habíamos puesto en evidencia en numerosas ocasiones, favorecido éste por la desviación del *septum*, que existía en nuestros dos casos.

Debemos hacer hincapié, en que nuestro procedimiento diagnóstico abarcó el estudio global de cada caso dentro de un cuadro clínico correspondiente a manifestación alérgica de vieja data, en que los alergenos comúnmente imputables no parecían estar en juego. Con ese razonamiento emprendimos el estudio, con alergenos de *Staphylococcus,* porque consideramos que a tales agentes sensibilizantes debe dárseles hoy día, también importancia.

En cuanto a la modalidad de los tratamientos en dosis progresivas y sub-intrantes, debemos también insistir que esa ha sido nuestra conducta cuando usamos alergenos que también pudieran ser tóxicos. Esto en aparente contradición con lo recientemente expuesto por CALDERÓN (6), sobre los peligros que ofrece la auto-vacunoterapia, que nosotros hemos venido usando desde hace muchos años, aun para erradicar focos de territorios tanto o más sensibles que los de nuestros casos, pero a condición de usarla sin dar tiempo al establecimiento de lo que nosotros consideramos período de incubación anti-taquifiláctico.

CONCLUSIONES

El estudio de los casos presentados nos hace llegar a las siguientes conclusiones:

1º) Las retinitis, por la gravedad de su decurso a veces incontrolable cuando los nexos etiológicos no resultan claros, deben también ser sospechadas como de origen alérgico focal.

2º) El estudio de la naturaleza focal no siempre demuestra un nexo macroscópicamente evidenciable entre el proceso infeccioso y las lesiones oculares.

3º) Frente a tales casos debe sospecharse la naturaleza alérgica de las

lesiones no sólo en dependencia de los alergenos mejor conocidos (bacilo de Koch, *Toxoplasma, Trichophyton,* etc.) sino también de estafilococos.

4º) Los estafilococos, por otra parte, pueden encontrarse tan sólo bajo la forma de microbismo latente y ser los responsables de la sensibilización ocular.

5º) Ciertas cepas patógenas de estos gérmenes demuestran *in vivo* e *in vitro* resistencia particular a los bacteriostáticos y antibióticos comunes. Su aislamiento, clasificación y preparación de autoalergenos permitirá el uso de estos últimos con fines diagnósticos y curativos.

6º) Los autores consideran que con el presente estudio se hace un nuevo aporte al conocimiento etiológico, diagnóstico y terapéutico de un grupo de retinitis que hasta el momento no había sido tomado en cuenta por oftalmólogos ni alergólogos, y constituye la primera comunicación al respecto.

RESUMEN

Por primera vez se presentan dos casos clínicos diagnosticados como retinitis alérgica debida a infección focal estafilocóccica.

Se revisan publicaciones en lo referente a sí la retina puede ser órgano de choque y si los *Staphylococcus* pueden comportarse como alergenos comunes.

Se describe el procedimiento diagnóstico seguido y que toma en cuenta antecedentes familiares y personales de manifestaciones alérgicas, sensibilidad demostrada a estafilococos con pruebas intradérmicas (reacción positiva inmediata) y aislamiento de cepas patógenas aún de mucosa nasal aparentemente sana.

Los autores, una vez establecido el diagnóstico, procedieron al tratamiento exclusivo con autoalergenos, logrando en ambos casos y en breve tiempo, la *restitutio ad integrum* de la mayor parte de las lesiones retinianas.

Queda así demostrada la retinitis alérgica a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus albus.*

SUMMARY

Two clinical cases diagnosed as allergic retinitis due to *Staphylococcus* are reported for the first time.

The literature is revised as to whether the retina has been shown to be a shock organ and whether *Staphylococcus* can act as a common allergen.

The method used in the diagnosis is described and involves the following data: family or personal allergy antecedents, sensitivity to staphylococcus intradermal test (immediate positive reaction), isolation of pathogenic strains even from apparently healthy nasal mucose.

The authors, with the diagnosis established, proceeded to an exclusive treatment with auto-allergens, obtaining in both cases and in a short time, the *restitutio ad integrum* of the majority of the retinian lesions.

Retinian allergy, to allergens from strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus albus* is thus demonstrated.

BIBLIOGRAFIA

1. BALYEAT, R. M.
1937. Retinal allergy. *Am. J. Ophth.*, 20:580-586

2. BEDELL, A. J.
1936. *New York State J. Med.*, 6: 583 (citado en URBACH).

3. BEISER, S. M. & Cols.
1958. Studies of materials derived from *Staphylococcus*. IV. Precipitating antibodies to Staphylococcal antigens in human sera. *J. Allergy*, 29 (1): 44-47.

4. BOTHMAN, L.
1940. The 1940 Year Book of the Eye, Ear, Nose and Throat, Chicago: *Yr. Bk. Pub.* :3 (citado en URBACH).

5. BRUNSTING, L. A. & Cols.
1955. Occurrence of cataracts and keratoconus with atopic dermatitis, *Arch. Dermat.*, 72: 237-240.

6. CALDERÓN, S.
1959. Comunicación personal.

7. COCA, A.
1930. Retinal Allergy. *Bull. New York Acad. Med.*, 6: 593-599.

8. COHEN, S. G. & Cols.
1957. *Staphylococcus aureus* antigens in hypersensitivity reactions and experimental arterial sensitization. *J. Allergy*, 28 (6): 531-539.

9. COOKE, R. A.
1947. *Allergy in Theory and Practice*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, x+572 pp.

10. CORTÉS, J. L.
1958. *Alergia Clinica. Principales características en México*. Impresiones Modernas, S. A., México, 2 tomos, xxiv + 1040 pp.

11. D'ERMO, F. & G. SALVI
1951. Antihistamine drugs and the eye; action on the conjunctival flora, *Boll. d'Ocul.*, 30: 3.

12. DWORETZKY, M. & Col.
1952. Pharmacologic and anaphylactogenic properties of *Staphylococcus* protein an unfractionated extract., *J. Allergy*, 23 (4): 359-364.

13. DWORETZKY, M. & Col.
1956. Biologic Effects of material derived from *Staphylococcus:* Further studies. *J. Allergy*, 27 (1): 39-49.

14. DWORETZKY, M. & Col.
1957. Studies of materials derived from *Staphylococcus*. III. Protective action of

gamma globulin against the anaphylactoid effects of a Staphylicoccal bacterial fraction. *J. Allergy*, 28 (3): 238-246.

15. DWORETZKY, M. & Col.
1958. Studies of materials derived from *Staphylococcus*. V. Immunologic relationship between a nucleoprotein fraction of two strains of *Staphylococcus* as determined by Anaphylaxis. *J. Allergy*, 29 (1): 48-55.

16. GOLDMAN, J. L.
1952. Bacterial and cytological diagnostic criteria in nasal and sinus disease., *Ann. Otol. Rhin & Larying.*, 61: 120.

17. GORDILLO-HERNÁNDEZ, D.
1958. El manejo de un nuevo corticoide en padecimientos alérgicos. *Rev. Alergia Méx.*, 6 (2): 3-14.

18. HANSEN, E. W.
1950. Allergy in Ophthalmology, *Tr. Am. Acad. Ophth.*, :299.

19. JIMÉNEZ-QUIRÓS, O. & Cols.
1959. Trabajo en preparación.

20. JIMÉNEZ-QUIRÓS, O. & Cols.
1959. Nota previa. Manifestaciones alérgicas en Oftalmología. *Rev. Biol. Trop.*, 7 (1): 131-132.

21. KHAN, M. C. & Col.
1951. Cutaneus reactions to *Staphylococcus* polysaccharide, protein and unfractionated extract in hypersensitive and normal individuals. *J. Allergy*, 23 (3): 237-248.

22. NICOLLE, M. & G. ABT
1908. Une conception général des anticorps et de leur effets. Les anticorps des albuminoids et des cellules. *Ann. Inst. Pasteur*, 22: 132.

23. PARDEE, J.
1938. Retinal Allergy. *J. Nerv. & Ment. Dis.*, 88:89.

24. PLUMER, J. S.
1937. Retinal Allergy. *Arch. Ophth.*, 17: 516.

25. PREWITT, L. H.
1937. Retinal Allergy. *Arch. Ophth.*, 18: 73.

26. SENEAR, F. E.
1951. Atopic dermatitis with bilateral cataracts. *Arch. Dermat & Syph.*, 63: 162 (Abstr. from *J. Allergy*, 22 (5): 68).

27. VELZEBOER, C. M. J.
1953. Ocular manifestations in Löffler's Syndrome. *Brit. J. Ophth.*, 37: 731.

28. URBACH, E.
1943. *Allergy*. Grune & Stratton, New York, 443 Fourth Avenue, New York City, xxii + 1073 pp.

INDICE DE AUTORES Y TRABAJOS DEL VOLUMEN VIII

REVISTA

DE

BIOLOGIA TROPICAL

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

VOLUMEN 8

1960

CONSTA DE II + VI + 280 PP. INCLUYENDO FIGURAS

Los artículos que se deseen someter para su publicación deberán ser enviados a: Dirección de "REVISTA DE BIOLOGIA TROPICAL", Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, Costa Rica, A. C. La correspondencia relativa a canje y suscriciones deberá dirigirse a: Biblioteca de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria, Costa Rica, A. C.

INFORMACION PARA LOS COLABORADORES

Esta REVISTA publica sólo trabajos originales e inéditos.

El COMITE DE REDACCION se reserva el derecho de aceptar o rechazar los trabajos recibidos. Los originales en ningún caso serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados en papel blanco de carta, escritos a máquina, a doble espacio, con tinta azul o negra y en páginas numeradas, indicándose la institución donde fueron realizados. Se aceptan trabajos que tengan como máximo 20 páginas; sólo excepcionalmente y a juicio del COMITE DE REDACCION, se publicarán trabajos mayores.

Se aceptan artículos en los siguientes idiomas: castellano, inglés, francés, portugués, italiano y alemán. Es obligatorio por lo menos un resumen en castellano.

La corrección de las pruebas de imprenta estará a cargo de los autores, pero se advierte que los trabajos enviados deben tener carácter definitivo.

Se aceptan fotos, cuadros y diseños, gráficos, etc. en tinta china y en número prudente, tomándose en cuenta las dimensiones de la REVISTA.

Las ilustraciones serán enviadas en hojas aparte con el nombre del autor y el número de la figura. Las leyendas correspondientes serán agrupadas por separado. En caso de microfotografías es necesario especificar el aumento.

Las citas bibliográficas, escritas en hoja aparte, seguirán el siguiente orden: apellido e inicial del nombre del autor, año, título del artículo por extenso, nombre de la revista (abreviación reconocida), volumen, número, primera y última página del artículo. En caso de libros, debe especificarse además la casa editora, lugar y número de edición.

Serán entregadas gratuitamente 100 copias de sus trabajos a los autores que están suscritos a la revista. Los no suscritos recibirán únicamente **50 copias.**

Suscripción anual: Costa Rica ₡ 10.00. **Otros paises $2.00**
Número suelto : Costa Rica ₡ 6.00. **Otros paises $1,25**

INFORMACION PARA LOS COLABORADORES

Esta REVISTA publica sólo trabajos originales e inéditos.

El COMITE DE REDACCION se reserva el derecho de aceptar o rechazar los trabajos recibidos. Los originales en ningún caso serán devueltos.

Los trabajos deben ser enviados en papel blanco de carta, escritos a máquina, a doble espacio, con tinta azul o negra y en páginas numeradas, indicándose la institución donde fueron realizados. Se aceptan trabajos que tengan como máximo 20 páginas; sólo excepcionalmente y a juicio del COMITE DE REDACCION, se publicarán trabajos mayores.

Se aceptan artículos en los siguientes idiomas: castellano, inglés, francés, portugués, italiano y alemán. Es obligatorio por lo menos un resumen en castellano.

La corrección de las pruebas de imprenta estará a cargo de los autores, pero se advierte que los trabajos enviados deben tener carácter definitivo.

Se aceptan fotos, cuadros y diseños, gráficos, etc. en tinta china y en número prudente, tomándose en cuenta las dimensiones de la REVISTA.

Las ilustraciones serán enviadas en hojas aparte con el nombre del autor y el número de la figura. Las leyendas correspondientes serán agrupadas por separado. En caso de microfotografías es necesario especificar el aumento.

Las citas bibliográficas, escritas en hoja aparte, seguirán el siguiente orden: apellido e inicial del nombre del autor, año, título del artículo por extenso, nombre de la revista (abreviación reconocida), volumen, número, primera y última página del artículo. En caso de libros, debe especificarse además la casa editora, lugar y número de edición.

Serán entregadas gratuitamente 100 copias de sus trabajos a los autores que están suscritos a la revista. Los no suscritos recibirán únicamente 50 copias.

Suscripción anual: Costa Rica ₡ 10.00. Otros países $2.00
Número suelto : Costa Rica ₡ 6.00. Otros países $1,25

49111 IMPRENTA METROPOLITANA